

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

СЕМЬЯНИХИНА АЛЕКСАНДРА ВЛАДИМИРОВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРИ
НАСЛЕДСТВЕННОМ И СПОРАДИЧЕСКОМ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ**

14.01.12 – Онкология

03.02.07 – Генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Любченко Людмила Николаевна

доктор медицинских наук

Расулов Арсен Османович

Москва — 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Факторы риска развития рака толстой кишки	13
1.2. Молекулярный патогенез рака толстой кишки	14
1.3. Молекулярная классификация рака толстой кишки	23
1.4. Роль соматических мутаций в генах МАРК-молекулярного сигнального пути... 33	33
1.5. Наследственный рак толстой кишки	38
1.5.1. Синдром Линча	44
1.5.2. Наследственный полипозный рак толстой кишки	50
1.6. Мультигенные таргетные панели в диагностике наследственных форм рака толстой кишки.	57
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	61
2.1. Материалы исследования и их характеристика	61
2.2. Молекулярные методы исследования	70
2.3. Статистическая обработка результатов исследования	78
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	80
3.1. Изучение клинико-генетических характеристик спорадического рака толстой кишки	80
3.1.1. ДНК-генотипирование соматических мутаций в генах <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> и <i>BRAF</i> в образцах опухолевой ткани больных генерализованным раком толстой кишки....	80
3.1.2. Оценка статуса микросателлитной нестабильности в образцах опухолевой ткани больных генерализованным раком толстой кишки	89
3.1.3. Оценка выживаемости больных генерализованным раком толстой кишки.	100
3.2. Изучение клинико-генетических характеристик наследственного рака толстой кишки	114
3.2.1. ДНК-генотипирование герминальных мутаций в генах <i>MLH1</i> и <i>MSH2</i>	114
3.2.2. Оценка выживаемости больных с синдромом Линча	128
3.2.3. ДНК-генотипирование герминальных мутаций в гене <i>APC</i>	132
3.2.4. ДНК-диагностика герминальных мутаций в генах, вовлеченных в	

канцерогенез злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта, с применением метода секвенирования нового поколения	137
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	146
4.1. Молекулярный профиль спорадического рака толстой кишки	146
4.2. Молекулярный профиль наследственного рака толстой кишки.....	173
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	189
ВЫВОДЫ	195
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	197
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	201

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы и степень ее разработанности

Под термином «колоректальный рак» (рак толстой кишки, РТК) понимают различные по форме, локализации и гистологической структуре злокачественные эпителиальные опухоли ободочной и прямой кишки. РТК является одной из самых частых злокачественных опухолей в мире. В 2012 г. по данным Globocan IARC¹ зафиксировано 1 360 602 новых случаев РТК, подавляющее большинство которых зарегистрировано в странах Запада. В структуре мужской и женской онкологической заболеваемости злокачественные поражения толстой кишки занимают третье и второе ранговые места, соответственно. Наблюдается неуклонное «омоложение» возраста больных РТК. Растет число пациентов с манифестацией заболевания в возрасте до 50 лет. Ежегодно от РТК погибают свыше 600 000 больных. В 2012 г. эта цифра составила 693 933 случая [109, 262].

Показатель заболеваемости раком ободочной и прямой кишки в России в 2014 г. составил у мужчин - 16,6 и 14,4 случаев на 100 000 населения, у женщин – 13,1 и 9,1, соответственно. На протяжении последних лет РТК стабильно остается в числе самых частых опухолей злокачественной природы, занимая пятое и шестое у мужчин и четвертое и седьмое ранговые места у женщин в структуре онкологической заболеваемости раком ободочной и прямой кишки, соответственно. Более чем в 20% случаев РТК продолжает диагностироваться на IV стадии заболевания [2, 3]. Несмотря на прирост активного выявления больных за последние пять лет, летальность в течение первого года после постановки диагноза превышает 25%. Морфологической верификации заболевания удается достичь более чем в 90% случаев. Средний возраст манифестации заболевания у женщин при раке ободочной и прямой кишки составляет 67,8 и 66,3 лет, у мужчин – 69,6 и 67,7 лет, соответственно. Положительная пятилетняя динамика наблюдается для показателя смертности от РТК. Так, число летальных случаев при опухолях ободочной кишки снизилось более чем на 5%, при опухолях прямой кишки – на 11%. В структуре смертности от онкологических заболеваний в

¹ IARC - International Agency for Research on Cancer (Международное Агентство по Изучению Рака)

старшей возрастной группе (старше 50 лет) опухоли ободочной и прямой кишки занимают четвертое и шестое места у мужчин и третье и шестое места у женщин [2].

РТК относится к группе генетически гетерогенных заболеваний, в патогенезе которого лежит ряд генетических и эпигенетических событий, приводящих к метапластическим изменениям в эпителии толстой кишки. Около 90%-95% вновь диагностированных случаев РТК являются по своей природе спорадическими (сРТК) и обусловлены активацией онкогенов либо подавлением экспрессии генов-супрессоров опухолевого роста, и, лишь, в 3-5% природа РТК определяется наличием герминальных мутаций в генах, ответственных за развитие РТК в составе синдромальной патологии. В канцерогенезе злокачественных эпителиальных опухолей толстой кишки выделяют три ведущих молекулярных механизма, современная классификация РТК, базирующаяся на их основе, учитывает микросателлитную и хромосомную нестабильности, статус метилирования, наличие соматических мутаций в генах *RAS/BRAF* и др., герминальных мутаций в генах-предрасположенности к РТК (*APC, MUTYH, MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2* и др.). Биологическое различие подтипов РТК определяет различное клиническое течение и прогноз заболевания. Молекулярное профилирование является ориентиром персонализированного подхода к лечению больных РТК, особенно с диссеминированным процессом, улучшая результаты лечения в данной группе пациентов. Так, соматический статус генов *EGFR*-зависимого сигнального пути (*KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA*) является предиктором ответа пациентов на таргетную терапию, статус микросателлитной нестабильности учитывается при планировании стратегии адъювантного лечения у больных локализованным РТК, а также выступает одним из маркеров эффективности назначения иммуннонаправленной терапии.

Наследственные формы РТК входят в состав ряда известных синдромов, характеризуются высокой генетической и фенотипической гетерогенностью, в подавляющем большинстве случаев – аутосомно-доминантным типом наследования, различной пенетрантностью, более ранним возрастом

возникновения и высоким риском вторых первичных опухолей. К таким высокопенетрантным синдромам относятся синдром наследственного неполипозного колоректального рака (в первую очередь, синдром Линча), ассоциированный с мутациями в генах системы репарации репликации ДНК - *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM*, семейный аденоматозный полипоз и его аттенуированную форму – с мутациями в гене *APC*, *MUTYH*-ассоциированный полипоз – с перестроениями в гене *MUTYH*, синдром Пейтца-Йегерса – с мутациями в гене *STK11*, ювенильный полипоз – с изменениями в генах *BMPRIA* и *SMAD4* и др. Своевременная диагностика данных состояний позволяет персонализировать подход к диагностике, лечению и профилактике как РТК, так и других злокачественных новообразований (ЗНО) в их составе. Молекулярная и фенотипическая гетерогенность нРТК определяют трудности дифференциальной диагностики при первичной постановке диагноза и выборе генов-кандидатов для ДНК-тестирования на первом этапе. Внедрение мультигенного тестирования позволяет оптимизировать диагностический процесс, но является более трудоемким, дорогостоящим, затратным по времени и, требующим биоинформатических ресурсов для интерпретации результатов, методом.

Несмотря на хорошо изученные молекулярные пути развития наследственного РТК (нРТК) и сРТК, в России представлены единичные работы, посвященные клиническому значению стратификации пациентов с учетом молекулярно-генетических особенностей опухоли и изучению отдаленных результатов лечения. Нет работ, посвященных комплексному анализу молекулярного профиля опухоли, в т.ч. у больных диссеминированным РТК, для которых оценка соматического генотипа является предиктором эффективности лекарственного лечения. Нет единого алгоритма молекулярно-генетической диагностики у пациентов с нРТК, который бы учитывал обобщенные данные мирового опыта и результаты аналогичных отечественных исследований, в т.ч. с применением новых молекулярно-генетических методик, основанных на технологиях секвенирования нового поколения. Не изучено прогностическое влияние патологического герминального генотипа у пациентов с колоректальным

раком в составе синдромальной патологии.

Цель исследования

Анализ молекулярно-генетических особенностей наследственного и спорадического колоректального рака и оценка их прогностического значения.

Задачи исследования

1. Изучить молекулярно-генетический профиль образцов опухолевой ткани больных генерализованным РТК;
2. Выполнить анализ клинико-морфологических характеристик пациентов с генерализованным РТК с учетом молекулярно-генетического статуса опухоли;
3. Оценить прогностическую значимость мутационного статуса генов *KRAS*, *NRAS* и *BRAF*, а также статуса микросателлитной нестабильности у пациентов с генерализованным РТК;
4. Изучить частоту и спектр молекулярно-генетической патологии у пациентов с наследственным РТК;
5. Проанализировать клинико-морфологические характеристики больных наследственным РТК в зависимости от генотипа;
6. Оценить влияние мутационного статуса генов *MLH1* и *MSH2* на результаты отдаленного лечения больных наследственным РТК.

Научная новизна

Впервые в России на большом клиническом материале, собранном в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, и данных ДНК-генотипирования выполнен комплексный анализ молекулярно-генетических особенностей наследственного и спорадического колоректального рака. Оценены частота и спектр герминальных мутаций в генах *MLH1* и *MSH2*, *APC*, соматических мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF*, выполнен анализ статуса микросателлитной нестабильности у больных нРТК и сРТК с последующей оценкой генотип/фенотип корреляций. Впервые в России оценены отдаленные результаты лечения пациентов генерализованным РТК в зависимости от

соматического профиля опухоли и больных нРТК с учетом статуса генов системы репарации неправильно спаренных оснований, показан вклад герминальных и соматических мутаций, а также статуса микросателлитной нестабильности в определение молекулярного подтипа РТК с целью индивидуализации диагностики, лечения и профилактики.

Теоретическая и практическая значимость

Выполненная комплексная молекулярно-генетическая диагностика нРТК позволит повысить эффективность медико-генетического консультирования пациентов и их семей, оптимизировать лечение больных, осуществлять диагностические и профилактические мероприятия, направленные на своевременное выявление и лечение вторых первичных опухолей у пациентов с синдромальной патологией. Анализ соматического профиля опухоли и статуса микросателлитной нестабильности, определяющих молекулярный подтип опухоли, позволит индивидуализировать лечение больных и прогнозировать течение заболевания. Метод секвенирования нового поколения (NGS²), примененный в исследовании и показавший высокую результативность, позволит повысить эффективность молекулярно-генетической диагностики. Результаты исследования могут быть использованы в профессиональной деятельности врачей-онкологов, генетиков, педиатров, колопроктологов и врачей широкой практики в учреждениях онкологического и общего профилей.

Методы и методология научного исследования

В исследование включены 365 пациентов с морфологически верифицированным диагнозом РТК, которые проходили обследование и/или находились на лечении в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 1972 по 2018 гг. Для достижения цели исследования сформирована статистическая база данных. Все пациенты стратифицированы на две исследовательские группы. В первую спорадическую группу включены 140 больных генерализованным РТК для изучения соматического профиля опухоли

² NGS – next generation sequencing (секвенирование нового поколения)

(поиск соматических мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* и оценка статуса микросателлитной нестабильности). Вторая герминальная группа объединила 143 пациента с формально-генетическим диагнозом наследственного рака толстой кишки в составе синдрома Линча или семейного аденоматозного полипоза. Для последующего клинко-морфологического сравнительного анализа была сформирована неотобранная контрольная группа больных РТК, включившая 82 больных с верифицированным диагнозом колоректального рака. Для герминальной группы выполнялось ДНК-генотипирование на предмет наличия герминальных мутаций в генах *MLH1*, *MSH2* и *APC*, в группе наследственного неполипозного рака также оценивались показатели микросателлитной нестабильности и статус гена *BRAF*, для больных с полипозным поражением толстой кишки – статус гена *KRAS*.

Поиск соматических мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* осуществлялся с применением ПЦР³ в режиме реального времени с последующим подтверждением выявленных изменений секвенированием по Сэнгеру. Статус микросателлитной нестабильности оценивался методом разделения длин таргетных участков (пяти однонуклеотидных маркеров) при проведении фрагментного анализа. Статус генов *MLH1*, *MSH2* и *APC* изучался с помощью методик конформационно-чувствительного гель-электрофореза, плавления высокого разрешения после проведения ПЦР в режиме Real-time⁴, капиллярного секвенирования и таргетного пиросеквенирования.

После выполнения молекулярно-генетических исследований проводилась оценка клинко-морфологических характеристик больных спорадическим и наследственным колоректальным раком в зависимости от опухолевого генотипа, статуса микросателлитной нестабильности и герминальных мутаций анализируемых генов со статистической оценкой частотных различий признаков. Анализ выживаемости без прогрессирования в группе спорадического рака, общей и опухоль-специфической выживаемости для больных наследственным

³ ПЦР – полимеразная цепная реакция

⁴ ПЦР в режиме Real-time (ПЦР в режиме реального времени)

колоректальным раком осуществлялся с применением метода Каплан-Майер с оценкой взаимосвязи между зависимой и независимыми переменными с помощью модели пропорциональных рисков Кокса.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программ математической обработки данных Microsoft Excel и IBM SPSS Statistics (версия 22).

Положения, выносимые на защиту

Больные генерализованным РТК характеризуются высокой частотой соматических активирующих мутаций в генах *RAS/BRAF* и низкой частотой опухолей с нестабильной системой репарации неправильно спаренных оснований. В 2/3 случаев патологический *NRAS* и *BRAF*-генотипы диагностируются у больных IV стадией РТК.

Мутантный *BRAF*-статус чаще диагностируется у женщин, достоверно ассоциирован с правосторонним поражением толстой кишки, наряду с высоким уровнем микросателлитной нестабильности достоверно чаще диагностируется в аденокарциномах низкой степени дифференцировки.

Патологический *RAS*-генотип превалирует в опухолях левой половины толстой кишки и представлен в большинстве случаев аденокарциномами средней степени дифференцировки. Активирующие *NRAS*-мутации определяют высокую частоту локо-регионарного метастазирования.

Больные с отсутствием соматических мутаций в генах *RAS/BRAF* и стабильной MMR⁵-системой характеризуются наилучшими показателями выживаемости без прогрессирования. Патологический *BRAF*-генотип у больных генерализованным MSS⁶-РТК обуславливает самую непродолжительную медиану времени без прогрессирования.

Мутантный статус генов *KRAS* и *BRAF*, а также высокий уровень микросателлитной нестабильности достоверно ассоциированы с уменьшением времени дожития относительно исхода и являются независимыми предикторами

⁵ MMR – mismatch repair system (система репарации неправильно спаренных оснований)

⁶ MSS – microsatellite stable (микросателлитно-стабильная опухоль)

прогрессирования РТК.

Выполнение хирургического вмешательства с максимальной циторедукцией у больных метастатическим РТК статистически значимо увеличивает медиану времени до прогрессирования по сравнению с больными, леченными только консервативным путем. Максимальный благоприятный прогностический эффект хирургического лечения достигается у больных с отсутствием активирующих мутаций в генах *RAS/BRAF*.

При клиническом соответствии рекомендациям Бетезда, частота носительства герминальных мутаций в генах *MLH1* и *MSH2* у больных РТК составляет 25,6%, соответственно. При множественном полипозе толстой кишки (>20 полипов) наследуемые мутации в гене *APC* диагностируются в 61,5% случаев.

Определение статуса микросателлитной нестабильности в образце опухолевой ткани является высокоэффективным диагностическим скрининговым тестом у больных с синдромом Линча. Для достижения оптимального эффекта включение однонуклеотидных маркеров в исследовательскую панель позволяет повысить диагностическую точность, в т.ч. при определении MSI⁷ в линч-ассоциированных ЗНО. Точность клинических критериев отбора «Амстердам I» «Амстердам II» составляет 85% и 75%, соответственно.

Пациенты с герминальными мутациями в гене *MSH2* характеризуются более широким спектром первично-множественных злокачественных новообразований и более высоким риском развития опухолей мочевыделительной системы в сравнении с больными с *MLH1*-наследуемыми вариантами. При этом, патологический *MSH2*-генотип определяет лучшую как общую, так и опухоль-специфическую выживаемость при РТК у больных с синдромом Линча по сравнению с пациентами-носителями герминальных мутаций в гене *MLH1*.

Высокопроизводительное секвенирование является эффективным диагностическим методом с высокой конкордантностью со стандартными методиками ДНК-тестирования. Оптимизация диагностического поиска,

⁷ MSI – microsatellite instability (микросателлитная нестабильность)

достигающаяся применением технологий NGS, позволяет верифицировать формально-генетический диагноз у пациентов с гетерогенными фенотипическими проявлениями и невозможностью исключения наследственной патологии при однократном молекулярно-генетическом тестировании.

Степень достоверности и апробация результатов

Все методы молекулярно-генетической диагностики, использованные в работе, соответствуют принятым стандартам ДНК-диагностики и молекулярно-биологических исследований. Полученные в ходе исследования автором собственные результаты не противоречат представленным в отечественной и международной литературе данным по изучению молекулярно-генетических характеристик рака толстой кишки. Достоверность и надежность представленных результатов основаны на адекватном выборе маркеров для диагностики, подборе соответствующих молекулярных методик, адекватности выборки больных и корректной статистической обработке данных.

Методы и результаты исследования внедрены в диагностическую практику ФГБУ «НМИЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. По теме диссертации опубликованы 5 печатных работ в научных изданиях, рекомендованных перечнем ВАК при Минобрнауки России. Основные положения работы доложены на II и III Всероссийских конференциях по молекулярной онкологии, на I Международном конгрессе «Редкие опухоли» и 53-й международной конференции Human Genetics ESHG⁸ в Гётеборге (Швеция).

⁸ ESHG – European Society of Human Genetics (Европейское общество по изучению генетики человека)

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Факторы риска развития рака толстой кишки

Риск развития РТК на протяжении жизни по мировым статистическим данным приближается к 4%-5%, при этом в 90% случаев колоректальный рак диагностируется в возрасте старше 50 лет. Факторы, влияющие на риск развития ЗНО толстой кишки, можно условно подразделить на модифицируемые и немодифицируемые [51].

К немодифицируемым факторам риска относят возраст, пол, расовые и национальные особенности, семейную историю, наличие у пациента аденоматозных или зубчатых полипов, воспалительные заболевания толстой кишки, сахарный диабет и др. Возраст считается главным фактором риска, как указано ранее, подавляющее большинство случаев РТК регистрируют после 50 лет [148]. Женщины реже болеют РТК, однако у них чаще выявляют спорадические полипы с поражением проксимальных отделов толстой кишки. На 3,7% повышает риск РТК неспецифический язвенный колит [66], а на 2,7% - болезнь Крона [41]. Наличие аденом размером более 1 см, или включающих более 25% villous компонента, а также аденомы с высокой степенью дисплазии позволяют относить пациентов в группу высокого риска опухолей толстой кишки. Наличие в семейном анамнезе одного родственника первой степени родства (ПСР) с РТК, диагностированным до 60-летнего возраста, повышает риск РТК вдвое, нескольких родственников – в четыре и более раз. Наследственные синдромы (семейный аденоматозный полипоз и др.) приближают риск манифестации РТК к 100% [37, 51, 81, 116, 124, 148]. Профилактические диагностические мероприятия и активное выявление ранних форм РТК являются главными инструментами для снижения заболеваемости и смертности в группе с немодифицируемыми факторами риска.

Употребление в пищу красного мяса, мясных субпродуктов, ожирение, курение и употребление алкоголя относят к группе модифицируемых факторов риска. В 2015 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ), опираясь на

доклад Международного агентства по изучению рака (IARC), формально отнесла мясные полуфабрикаты к канцерогенным, а красное мясо к группе «вероятно канцерогенных» веществ [33]. В целом, погрешности в диете могут повышать риск развития РТК более чем на 70% [146]. При потреблении красного мяса в значительной степени возрастает образование канцерогенных N-нитрозо-соединений, цито- и генотоксичных альдегидов при липопероксидации [19]. Ожирение вызывает формирование висцеральной гормонально-активной жировой ткани, что в свою очередь потенцирует синтез провоспалительных цитокинов, приводя к воспалительным изменениям в толстой кишке, резистентности к инсулину и активации метаболических ферментов [162]. Несмотря на то, что в ряде работ показано, что риск РТК при табакокурении возрастает только у длительно курящих, считается, что «никотиновая зависимость» повышает риск РТК в среднем до 10,8% благодаря метаболитам никотина, которые легко достигают толстой кишки, потенцируя образование и рост полипов [32, 160].

К модифицируемым факторам относятся и те, которые снижают риск развития РТК. Так, включение в рацион достаточного количества фруктов и овощей, а также продуктов, богатых клетчаткой и кальцием, ассоциировано с редукцией риска опухолей толстой кишки [47]. Регулярные занятия спортом, здоровый образ жизни и поддержание оптимального индекса массы тела – неотъемлемые компоненты профилактики РТК.

Лекарственная профилактика РТК является одним из перспективных направлений в современной онкопроктологии. Активно изучается влияние нестероидных противовоспалительных препаратов. По данным американской группы ученых прием аспирина снижает вероятность развития РТК на 20% при, по меньшей мере, его 10-летнем приеме [23]. Лимитированное число исследований позволяет относить антиоксиданты, фолиевую кислоту, витамины В₆ и D₃ в группу веществ, снижающих риск РТК [47, 146].

1.2. Молекулярный патогенез рака толстой кишки

В патогенезе РТК лежит пролиферация опухолевого клона клеток кишечного эпителия. В зависимости от природы мутаций, инициирующих

неопластический процесс, условно РТК подразделяют на sporadic, наследственный и семейный варианты. Более чем в 70% случаев РТК является sporadic, т.е. обусловленным мутационными событиями в эпителиальных клетках толстой кишки [148]. Наследственные формы РТК встречаются примерно в 3-5% случаев злокачественных опухолей толстой кишки и ассоциированы с носительством герминальных мутаций в генах, ответственных за развитие различных вариантов полипозного и неполипозного наследственно-обусловленного РТК [148]. Полипозный вариант представлен в подавляющем большинстве случаев семейным аденоматозным полипозом и реже другими наследственными синдромами (Пейтца-Йегерса, Коудена и др.). К неполипозным вариантам РТК относят синдром Линча, ответственный за 2-3% РТК, и линч-подобные состояния – гетерогенную группу заболеваний, встречающихся гораздо реже [43]. К многочисленной группе, на долю которой приходится около 20-25% онкологических заболеваний толстой кишки, семейной форме РТК, относят случаи, не соответствующие критериям определенной синдромальной патологии, однако, при которых, ввиду отягощенного семейного анамнеза и клинической истории, нельзя исключить наследственный характер заболевания и/или, при ДНК-диагностике которых, молекулярно-генетический дефект не был выявлен.

Молекулярный патогенез РТК представляет последовательность мутационных событий, описанных Vogelstein и соавт. в 1988 г. [276]. Эволюционный путь от аденомы (классической или зубчатой) до злокачественной опухоли занимает в среднем около 10 лет [276]. Примерно в 30-35% случаев РТК развивается из зубчатых аденом – доброкачественных эпителиальных новообразований, включающих в себя гиперпластические полипы (Hyperplastic polyps (HP)), зубчатые аденомы на широком основании (Sessile Serrated Adenomas (SSP)) и традиционные зубчатые аденомы (Traditional Serrated Adenomas (TSA)) [31]. Классические аденомы, являющиеся наиболее частым вариантом диспластических образований толстой кишки, подразделяют на тубулярные, ворсинчатые и тубуло-ворсинчатые образования [31]. Альтернативным путем канцерогенеза РТК является развитие диспластических изменений в эпителии

толстой кишки на фоне хронического воспаления при неспецифическом язвенном колите и болезни Крона [31].

В процесс канцерогенеза РТК вовлечены два главных молекулярных сигнальных пути. Wnt-сигнальный путь, играющий важную роль в поддержании клеточного баланса, дифференцировке и пролиферации клеток эпителия, является ключевым и первым звеном в череде мутационных событий при РТК [261, 276]. Аномальная активация Wnt-пути вследствие мутаций в генах *APC* или *CTNNB* встречается примерно в 90% случаев РТК [261]. Вторым сигнальным путем, активированным при колоректальном раке, является Notch-сигналинг, участвующий в дифференцировке клеток, поддержании фенотипа стволовых клеток, определении полярности клетки и миграции. Мутации в этом каскаде ассоциированы с поддержанием опухолеиницилирующих клеток и процессов метастазирования [4, 31].

Классический морфологический путь «аденома→рак» начинается с изменения архитектуры эпителиальных крипт, эндоскопически визуализируемых как фокусы аберрантных крипт (ФАК, aberrant crypt foci; (ACF)), в которых активирующие мутации в гене *KRAS* могут определяться уже на данном этапе [31]. Первые мутационные события, инактивирующие ген-супрессора *APC*, ассоциированы с появлением признаков эпителиальной дисплазии и эволюции ФАК в аденомы, около 15% которых в дальнейшем эволюционируют в свою очередь в рак в течение последующих 10 лет [158, 274]. Аденомы с низкой степенью дисплазии, как правило, представляют собой небольшие образования, чаще тубулярные, с незначительными ядерно-цитоплазматическими признаками дисплазии. При активации теломеразы, аденомы приобретают черты дисплазии тяжелой степени: крупные, с выраженным villous компонентом и цитонуклеарными изменениями. Прогрессия в инвазивный рак сопряжена с соматическими мутациями в гене *TP53*, а метастазирование опухоли часто ассоциировано с инактивацией гена *SMAD4* [31]. Основные мутационные события в канцерогенезе РТК представлены на рисунке 1 [31, 69].

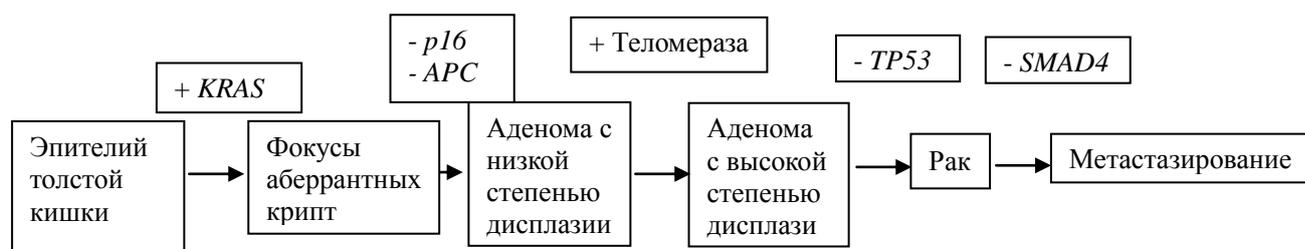


Рисунок 1 - Основные этапы канцерогенеза РТК

Молекулярный канцерогенез РТК, возникающего на фоне хронических воспалительных заболеваний, обладает рядом отличий. Ключевым медиатором, запускающим процесс диспластических изменений в эпителии, является транскрипционный фактор NF- κ B, индуцирующий экспрессию провоспалительных цитокинов, COX2 и TNF, вклад которых в инициацию опухолевого роста изучен и доказан в многочисленных исследованиях [41, 143]. Кроме того, инактивация гена *TP53* в таких опухолях встречается уже на ранних этапах канцерогенеза, а соматические мутации в гене *APC* встречаются реже в сравнении со спорадическими формами РТК, возникающих из аденом [31].

Важным фактором, лежащим в основе спорадического РТК, является **геномная нестабильность (ГН)** [90]. Патогенетические механизмы, приводящие к появлению ГН, могут быть сведены к трем основным путям: хромосомная нестабильность (chromosomal instability, CIN), микросателлитная нестабильность (microsatellite instability, MSI) и, так называемый, CIMP-фенотип (CpG island methylator phenotype) или фенотип, обусловленный метилированием CpG-островков [89, 90].

Хромосомная нестабильность, определяющая классический вариант развития ГН, обнаруживается примерно в 80%-85% случаев РТК [89] и выражается в нарушении числа хромосом, приводя к анеуплоидии клеток опухоли и потере в них гетерозиготности (loss of heterozygosity, LOH). Несмотря на то, что CIN – частое событие при РТК, механизмы, вызывающие ее развитие, а также роль анеуплоидии в опухолевой прогрессии остаются до сих пор до конца неясными [90]. Тот факт, что CIN выявляется в аденомах толстой кишки,

позволяет сделать предположение о том, что CIN возникает на этапе инициации опухолевого процесса [88, 226]. Изменения хромосомной сегрегации, дисфункция теломер и нарушения в механизмах ответа клетки на повреждение ДНК при CIN – патогенетические звенья, вовлекающие в процесс одни из главных генов, регулирующих клеточный цикл – *APC*, *KRAS*, *PIK3CA*, *TP53* и др. Соматические мутации в гене *APC* через активацию β-катенина запускают транскрипцию генов, вовлеченных в канцерогенез и опухолевую инвазию, в то время как мутации в генах *KRAS* и *PIK3CA* приводят к перманентной активации MAP-киназы, повышающей клеточную пролиферацию. Одним из заключительных событий является выключение функции гена *TP53*, кодирующего белок p53 – главного «стража клеточного генома», вызывая бесконтрольное клеточное деление [276].

Микросателлитная нестабильность, встречающаяся примерно в 15% опухолей толстой кишки [90], является результатом инактивации генов системы репарации неправильно спаренных оснований клеточной ДНК либо посредством гиперметилирования, либо в результате соматических или герминальных мутаций [88]. К генам, вовлеченным в процесс репарации ДНК и потеря функции которых приводит к MSI, относят *MLH1*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *EPCAM*. У пациентов с синдромом Линча патогенез MSI обусловлен герминальными мутациями в генах *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* и *EPCAM*. В спорадических опухолях в подавляющем большинстве случаев потеря MMR-активности происходит путем aberrантного метилирования гена *MLH1*. Другим важным отличием спорадического РТК является наличие соматических мутаций в гене *BRAF*, встречающихся с высокой частотой при данном варианте РТК и не диагностирующихся при синдроме Линча [60, 277]. Природа данного феномена остается неустановленной на сегодняшний день [239]. Среди опухолей с MSI примерно две трети случаев приходится на спорадические формы РТК и одна треть связана с герминальными мутациями в системе генов репарации неправильно спаренных оснований ДНК [271].

Микросателлитная нестабильность редко диагностируется в доброкачественных опухолях толстой кишки и обнаруживается в отдельных

случаях в зубчатых полипах, за исключением синдрома Линча, при котором микросателлитная нестабильность определяется в тубулярных аденомах [107, 192]. В ряде исследований показано, что MSI-High⁹ не достаточно для индукции роста полипов [39], однако его наличие определяет крайне быструю эволюцию доброкачественной опухоли в злокачественное новообразование, что занимает в среднем 2-3 года [90]. Другим подтверждением данного факта служит определение MSI-High в подавляющем большинстве случаев в аденомах с высокой степенью дисплазии [192].

CIN и MSI считаются взаимо-исключающими событиями. Клетки опухолей с MSI, как правило, характеризуются диплоидным кариотипом и накоплением специфических мутаций в генах, отличных от таковых при CIN, хотя описаны случаи РТК с сочетанием CIN и MSI [280]. Ранние этапы канцерогенеза РТК как при CIN, так и при MSI являются схожими, однако их клиническое поведение различается. Опухоли с MSI чаще располагаются в правой половине толстой кишки, имеют муцинозный или медуллярный патогистологический варианты с лимфоцитарной инфильтрацией, характеризуются низким метастатическим потенциалом и отличаются более благоприятным клиническим течением [31, 210, 271, 279]. По данным клинического исследования PETACC-3 MSI-High чаще диагностируется в образцах РТК со II клинической стадией заболевания (по сравнению с III стадией (22% vs 12%)) [138]. В другом клиническом исследовании опухоли с MSI-High у больных с IV стадией РТК выявлены только в 3,5% случаев [141]. В ряде исследований доказан благоприятный прогностический вклад статуса MSI в общую и бессобытийную выживаемости, особенно у больных I-II стадией РТК, убедительных данных за прогностический эффект MSI у пациентов с III стадией получено не было, в случае метастатического поражения MSI-High является одним из факторов неблагоприятного исхода [20, 56, 84, 247]. Нестабильный MMR-генотип является предиктором неэффективности терапии 5-ФУ и его аналогами, однако, выступает одним из маркеров успешной иммунотерапии [56, 123, 247].

⁹ MSI-High – high level of microsatellite instability (высокий уровень микросателлитной нестабильности)

Согласно утвержденным Национальным Раковым Институтом (NCI (National Cancer Institute)) рекомендациям высокий уровень микросателлитной нестабильности (MSI-High(MSI-H)) определяется наличием не менее 30% нестабильных локусов в панели из 5-10 участков, содержащих моно- и динуклеотидные повторы [26]. В большинстве лабораторий на сегодняшний день принято оценивать MSI с применением 5-моонуклеотидной панели, включающей маркеры BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 и NR-27, отобранных в связи с их высокой чувствительностью и специфичностью при диагностике РТК с нарушениями в системе MMR [12]. Опухоли толстой кишки с менее 30% нестабильных локусов относят к группе MSI-Low (MSI-L). Несмотря на то, что MSI-Low-РТК имеет ряд клинико-молекулярных особенностей, позволяющих отличить его от MSI-High или MSS-ассоциированных опухолей, выделение его в отдельную молекулярную подгруппу остается на сегодняшний день сомнительным [89].

В соответствии с рекомендациями Американского общества клинических онкологов (ASCO, American Society of Clinical Oncology), а также клиническими рекомендациями NCCN (National Comprehensive Cancer Network) иммуногистохимическое исследование образцов опухоли РТК с целью оценки экспрессии белков MMR-системы и/или тестирование MSI должно быть выполнено всем пациентам с РТК или (альтернативный путь) больным РТК в возрасте до 70 л., а для пациентов старше 70 л. в случае соответствия одному из пересмотренных рекомендаций Бетезда [8, 16, 184].

Другим частым событием при РТК является эпигенетическая нестабильность. Абберрантное метилирование встречается в подавляющем большинстве злокачественных эпителиальных опухолей толстой кишки, однако в 15-20% случаев выявляется гиперметилирование с последующей инактивацией целого ряда генов, в т.ч. генов-супрессоров опухолевого роста, что позволило выделить такие случаи РТК в отдельную группу и охарактеризовать как опухоли с **СИМР-фенотипом** [4, 21].

Механизм активации процессов избыточного метилирования в клетках

толстокишечного эпителия до сих пор остаются предметом научного поиска. Среди возможных причин называются повышенная экспрессия ДНК-метилтрансфераз DNMT3B или DNMT1, инактивация клеточных барьерных механизмов, предотвращающих чрезмерное метилирование, нарушение процессов клеточного старения и мутации в генах, ответственных за ремоделирование хроматина, таких как *CDH8* и др. [113, 114, 253, 258]. Соматические мутации в генах *IDH1* и *TET*, приводящие к активации метилирования в глиомах и при лейкозах, также относят к причинам развития CIMP-фенотипа при РТК [110]. Исследования *in vitro*¹⁰ не выявили причинно-следственной связи между мутантным статусом гена *BRAF* и степенью метилирования в образцах опухоли РТК [103].

CIMP диагностируется в случае метилирования не менее трех локусов из отобранной панели генов, содержащих CpG-островки. Регламентированной диагностической панели для определения статуса CIMP на сегодняшний день не разработано. Среди наиболее применимых - панель, разработанная Peter Laird и соавт. [282] и включающая гены *CACNA1AG*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3* и *SOCS1*. Часть исследователей выделяют подклассы CIMP, основываясь на числе измененных локусов (CIMP-low (<2/5 маркеров) и CIMP-high (>3/5 маркеров) [17].

CIMP-фенотип ассоциирован с канцерогенезом РТК из зубчатых аденом, т.н. «зубчатый путь» (the serrated pathway). Характерное фенотипическое «зубчатое» очертание в кишечных криптах обусловлено избыточным накоплением эпителиальных клеток вследствие ингибирования механизмов апоптоза. Для РТК, развивающихся по зубчатому пути, характерно расположение в проксимальных отделах толстой кишки, накопление мутаций в гене *BRAF*, чаще всего V600E, и MSI-High как результат метилирования промотерной области гена *MLH1* [31]. В 2007 г. Jass и соавт. предложили три молекулярных подтипа для «зубчатых» форм РТК [298]:

1. *mutBRAF*, CIMP-High, MSI-High;
2. *mutBRAF*, CIMP-High, MSS;

¹⁰ In vitro – в искусственных условиях

3. *mutKRAS*, CIMP-Low, MSS.

РТК подтипов 1 и 2 чаще развивается из зубчатых аденом на широком основании и характеризуется высоким показателем CIMP независимо от выбранной панели генов для оценки статуса метилирования. Традиционные зубчатые аденомы дают начало опухолям толстой кишки 3 подгруппы. Ввиду отсутствия регламентированной панели маркеров для определения CIMP, а также противоречий в определении степени аномального метилирования, классифицировать РТК в 3 подгруппу не всегда представляется возможным [21].

Аномальное метилирование с высокой частотой встречается в фокусах aberrантных крипт, тубуло-виллезных и зубчатых аденомах [46, 155], при этом CIMP-фенотип наблюдается только в зубчатых образованиях.

Оценка степени метилирования является не только прогностическим или предиктивным, но и диагностическим маркером при РТК. Так, гиперметилирование генов *BMP3* и *NDRG4*, вовлеченных в канцерогенез РТК, наряду с оценкой статуса гена *KRAS* и анализом кала на скрытую кровь, является фундаментом скринингового теста для РТК, одобренного FDA. Специфичность предложенного метода составляет 86% более с чем 90% чувствительностью [106].

Наряду с aberrантным гиперметилированием, снижение уровня метилирования также описано для РТК [163, 224]. Так, LINE-гипометилирование чаще встречается в MSS-ассоциированных опухолях толстой кишки у пациентов с отягощенным семейным анамнезом [65]. В ряде исследований показана корреляция между гипометилированием и выживаемостью пациентов с РТК, однако, истинное клиническое приложение остается на стадии изучения [193].

Генетические и эпигенетические изменения в эпителиальных опухолях толстой кишки не встречаются изолированно, а происходят параллельно с более высокой частотой метилирования нежели соматических мутаций, как считалось ранее [144]. Одним из примеров является наличие мутаций в гене *BRAF* наряду с микросателлитной нестабильностью в большинстве опухолей с CIMP-фенотипом [282].

1.3. Молекулярная классификация рака толстой кишки

Высокая патогенетическая гетерогенность РТК, обусловленная вовлечением различных этиологических молекулярных путей в канцерогенез злокачественных опухолей толстой кишки, обосновала необходимость создания классификации колоректального рака, учитывающей основные молекулярно-генетические изменения. Молекулярные подтипы РТК характеризуются наряду со специфическими изменениями в геноме различиями в морфологических характеристиках опухоли, клиническом течении заболевания, ответе на специфическое лечение и таргетную терапию, а также отдаленных результатах лечения пациентов [180].

Одна из первых работ, систематизировавшая молекулярные черты РТК, основывается на определении статуса хромосомной и микросателлитной нестабильности, CIMP-фенотипа, соматических мутаций в генах *KRAS*, *BRAF*, *APC* и др. [118]. К **первому подтипу** относят опухоли с высоким уровнем CIMP, метилированием промотерной области гена *MLH1*, наличием *BRAF*-мутации, хромосомно-стабильным фенотипом и высоким показателем микросателлитной нестабильности (MSI-H). На долю данного подтипа, условно называемого – спорадический MSI-H-РТК, приходится около 12% от всех случаев РТК. **Второй подтип** включает опухоли с высоким уровнем CIMP, наличием или отсутствием метилирования промотерной области гена *MLH1*, патологическим *BRAF*-генотипом, отсутствием или низким уровнем хромосомной и микросателлитной нестабильности (MSS или MSI-L) и ответственен за 8% опухолей толстой кишки эпителиальной природы. К **третьему подтипу** относят РТК с низким уровнем CIMP, наличием *KRAS*-мутации, метилированием гена *MGMT*, хромосомной нестабильностью, отсутствием или низким показателем MSI (MSS или MSI-L). Встречается такой фенотип в 20% случаев. Самый многочисленный **четвертый подтип** наблюдается в 57% опухолей и включает CIMP-негативный статус, хромосомную нестабильность, отсутствие MSI (MSS). **Пятый подтип**, на долю которого приходится около 3% случаев, характеризуется CIMP-негативным статусом, отсутствием хромосомной нестабильности и мутаций в гене *BRAF*,

высоким уровнем микросателлитной нестабильности и описан как наследственный MSI-H РТК (в подавляющем большинстве случаев в составе синдрома Линча). Детерминированность молекулярных путей развития определяет эволюцию злокачественной опухоли через различные предопухолевые состояния. Так, зубчатые полипы являются «предшественниками» РТК подтипов 1 и 2, тогда как в группах 4 и 5 классические тубуло-виллезные аденомы эволюционируют в рак. Подтип 3 может задействовать оба пути развития.

Основные молекулярные, клинические и морфологические характеристики разных молекулярных подтипов РТК согласно классификации Jass представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Молекулярные подтипы РТК по классификации Jass (2007) [118].

	Подтип 1	Подтип 2	Подтип 3	Подтип 4	Подтип 5
MSI	MSI-H	MSS/MSI-L	MSS/MSI-L	MSI-L	MSI-H
Метилирование	+++	+++	++	+/-	+/-
Плоидность	Диплоидия> Анеуплоидия	Диплоидия> Анеуплоидия	Анеуплоидия > Диплоидия	Анеуплоидия> Диплоидия	Диплоидия> Анеуплоидия
<i>mutAPC</i>	+/-	+/-	+	+++	++
<i>mutKRAS</i>	-	+	+++	++	++
<i>mutBRAF</i>	+++	++	-	-	-
<i>mutTP53</i>	-	+	++	+++	+
Локализация	Справа>Слева	Слева>Справа	Слева>Справа	Справа>Слева	Справа>Слева
Пол	Ж ¹ >М ²	Ж>М	М>Ж	М>Ж	М>Ж
Предопухолевая патология	Зубчатый полип	Зубчатый полип	Зубчатый полип/ Тубулярная/ виллезная аденома	Тубулярная/ виллезная аденома	Тубулярная/ виллезная аденома
Степень «зубчатости»	+++	+++	+	+/-	+/-
Наличие слизистого компонента	+++	+++	+	+	++
Наличие некроза	+	+	н/д ³	+++	+
Низкая дифференцировка	+++	+++	+	+	++
Наличие перстневидных клеток	+++	+	н/д	++	++

Лимфоваскулярная инвазия	+/-	+	н/д	+++	+
Лимфоцитарная инфильтрация	+++	+	н/д	+	+++

Примечания: 1 – Ж – женщины; 2 – М – мужчины; 3 – н/д – нет данных.

В 2015 г. Phipps и соавт. оценили корреляцию разработанной классификации Jass с выживаемостью в различных группах пациентов с РТК. В исследование было включено 2 706 больных с периодом наблюдения от 5 до 14 лет. Опухолевый материал был доступен для 2 080 пациентов, для 99% образцов была получена информация хотя бы по одному анализируемому маркеру, данные по всем исследуемым параметрам были представлены для 65% больных. В результате исследования в 16% образцов был выявлен высокий уровень микросателлитной нестабильности (MSI-H), в 13% и 31% случаев были выявлены соматические мутации в генах *BRAF* и *KRAS*, соответственно и в 18% - CIMP-позитивный фенотип. Основываясь на полученных результатах, было выполнено распределение образцов по молекулярным подгруппам: подтип 1 выявлен в 7% (n=100), подтип 2 – в 4% (n=55), подтип 3 – в 26% (n=353), подтип 4 – в 47% (n=631) и подтип 5 – в 4% (n=50). Пациенты 1 и 2 молекулярных групп характеризовались более поздним возрастом манифестации заболевания и доминированием женского пола. В этих же группах, а также в подтипе 5 опухоли более чем в 80% случаев локализовались в проксимальных отделах толстой кишки. При анализе отдаленных результатов лечения худший показатель как общей, так и опухоль-специфической выживаемости, наблюдался в группе 2, где 5-летняя выживаемость составила 46% с крайне редкими случаями диагностирования заболевания на ранних стадиях. Эти же показатели оказались самыми высокими в подтипах с высоким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI-H), т.е. подтипах 1 и 5 [208].

Современные подходы к классификации опухолей толстой кишки с учетом

их генетического статуса основываются на данных расширенного молекулярного профилирования опухолей [303]. Так, Sadanandam и соавт. выполнили кластерный анализ экспрессии 786 генов в 445 образцах РТК и выделили 5 подтипов, отражающих кластер генов с наиболее высокой экспрессией: бокаловидноподобный, энтероцитоподобный, переходноклеточный, воспалительный и стволовоклеточный подтипы РТК [231]. Основные клинико-молекулярные характеристики подтипов представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Основные клинико-молекулярные характеристики подтипов по классификации Sadanandam и соавт. [231].

	Стволово-клеточный подтип	Воспалительный подтип	Переходно-клеточный подтип		Бокаловидно-подобный подтип	Энтероцитоподобный подтип
			Цетуксимаб-резистентный	Цетуксимаб-чувствительный		
Локализация	Основание крипты	-	Любое	Любое	Вершина крипты	Вершина крипты
Маркеры	<i>SFRP2</i> , <i>ZEB1</i>	<i>RARRES3</i>	<i>CFTR</i> , <i>FLNA</i>	<i>CFTR</i> , (<i>FLNA</i>)	<i>MUC2</i> , <i>TFF3</i>	<i>MUC2</i> , (<i>TFF3</i>)
Прогноз	Неблагоприятный	Промежуточный	Неблагоприятный	Благоприятный	Благоприятный	Промежуточный

Три молекулярных подтипа РТК было выделено De Soso E Melo и соавт. с помощью экспрессионного профилирования более 1 100 образцов опухоли толстой кишки, при этом первые два подтипа имели высокую конкордантность с описанными ранее группами РТК с CIN и MSI. В то время как подтип 3, новый, ранее не представленный вариант со стабильной системой репарации (MSS) и маркерами эпителиально-мезенхимального перехода и экстрацеллюлярного ремоделирования [252].

Эпигенетический статус РТК лег в основу классификации, представленной Ogino и соавт. [194]. Подтип 1 – CIMP1, ассоциированный с интенсивным метилированием большого числа генов, MSI-H и мутациями в гене *BRAF*. Подтип 2 – CIMP2, характеризующийся наличием мутацией в гене *KRAS*, а также метилированием несколько генов, в т.ч. ответственных за механизмы старения клетки. Подтип 3 – CIMP-негативный с метилированием единичных генов и мутациями в гене *TP53*. Все три подтипа представляют собой достаточно

гомогенные группы на молекулярном уровне и крайне показательны в клиническом представлении трех различных типов РТК. СІМР1 и СІМР2 чаще ассоциированы с проксимальным РТК. Женский пол, наличие выраженной железистой «зубчатости» с муцинозной дифференцировкой или плохо дифференцированными железами с лимфоцитарной инфильтрацией и хроноподобный фенотип характерны для подгруппы СІМР1. Опухоли из группы СІМР1 также отличает лучший прогноз заболевания, в подавляющем большинстве случаев за счет MSI-High статуса, что прямо противоположно подтипу СІМР2 с неблагоприятным клиническим прогнозом. Зубчатые полипы являются предопухолевым образованием для РТК из группы СІМР1, villous adenomas – для СІМР2. Среди подгрупп с aberrantным метилированием выделены и два различных молекулярных патогенетических пути [125]: СІМР1 в сочетании с *BRAF*-мутацией встречается в большинстве синдромальных, спорадических и MSI-High-ассоциированных форм РТК. Примерно в 12-15% опухолей с высоким показателем микросателлитной нестабильности эпигенетическое «выключение» гена *MLH1* является ключевым событием, приводящим к MSI-H с быстрой прогрессией от низкой до высокой степени дисплазии к инвазивному раку. *KRAS*-мутации, ассоциированы с подгруппами СІМР2 и СІМР3, со стабильной системой репарации и инактивацией гена *TP53*.

Интегративный молекулярный анализ образцов опухоли РТК в рамках TCGA – проекта (the Cancer genome Atlas project) [42], основанный на геномных и транскриптомных исследованиях с применением технологий массивного секвенирования, позволил исследователям выделить две большие группы, сопоставимые с разработанными ранее классификациями:

1. ~16% опухолей с гиперметилированием либо с MSI-H вследствие дефицита в системе репарации неправильно спаренных оснований (~13%), либо с гипермутабельным статусом (~3%);
2. ~84% опухолей с низким уровнем метилирования, с отсутствием микросателлитной нестабильности, хромосомно-нестабильные (с изменением

числа копий генов) с накоплением соматических мутаций в генах *APC*, *TP53*, *KRAS*, *SMAD4* и *PIK3CA*.

В исследование включено 276 образцов периферической крови и 224 образца опухолевой ткани пациентов с РТК. Параллельно экзомному секвенированию, был проведен анализ степени метилирования, экспрессии мРНК и микроРНК. Группа РТК с гиперметилированием в дальнейшем была подразделена на две подгруппы: к первой (наиболее многочисленной) отнесли опухоли с высоким уровнем мутаций (10-40 мутаций/Мб) и *MLH1*-метилированием в большинстве случаев, во вторую наименьшую подгруппу вошел РТК с парадоксально высокой мутационной активностью (>40 мутаций/Мб). Почти все случаи с аномальным метилированием демонстрировали характеристики CIMP-фенотипа. В небольшом числе образцов из группы 1 TCGA были выявлены либо герминальные, либо соматические мутации в системе MMR. Гипермутабельные опухоли характеризовались наличием мутаций в экзонуклеазном домене гена *POLE* и в гене *POLD1*.

Консорциум по интеграции молекулярных подтипов (the Consensus Molecular Subtypes (CMS) Consortium) после анализа данных экспрессионного профилирования опухолей РТК в многочисленных исследованиях представил 4 молекулярные группы [94, 263]: все опухоли с гиперметилированным статусом и MSI-High были отнесены к первой категории CMS1 (14%), вторая категория – классический РТК (CMS2 (37%)), метаболический РТК представляет третью категорию (CMS3 (13%)) и мезенхимальный РТК (CMS4 (23%)) – четвертую. Отдельная неклассифицируемая группа – смешанный РТК (13%).

Основные молекулярно-генетические характеристики CMS-подтипов представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Основные молекулярно-генетические характеристики CMS подтипов РТК.

	CMS1	CMS2	CMS3	CMS4
Альтернативное название	иммунный (микросателлитно-нестабильный)	классический	метаболический	мезенхимальный
Первичные характеристики	Гипермутабельность, MSI-H, выраженная иммунная реакция, низкое число CNV ¹	Активация WNT и MYC-сигнальных путей, CIN, низкое (среднее) число мутаций	Выраженная метаболическая дисрегуляция, CIN, низкое (среднее) число мутаций	Активация TGF β , инвазия стромы и повышенный ангиогенез, CIN, низкое число мутаций, высокий процент CNV
Частота	14%	37%	13%	23%
Предопухолевые состояния	Зубчатые полипы	Тубулярные аденомы	Тубуловиллезные аденомы с признаками «зубчатости»	Зубчатые полипы
Эпигеномные изменения	Гиперметилирование	Низкий уровень метилирования	Промежуточный уровень метилирования	Низкий уровень метилирования
Транскриптомные изменения	Иммунный ответ, JAK-STAT и каспазная активация	Активация <i>RAS</i> , <i>MYC</i> , <i>EGFR</i> , <i>SRC</i> , <i>VEGF</i> , <i>VEGFR</i> , интегрин, <i>TGFβ</i> , <i>IGF</i> , <i>IRS2</i> , <i>HNF4a</i> , <i>HER2</i> , циклина	Изменения в механизмах репарации ДНК и контроле клеточного цикла, глутаминолизис, липидогенез,	Эпителиально-мезенхимальный переход, активация комплимента, интегринов, иммуносупрессия,
Иммунное микроокружение	Низкое число ОАФ ² , высокая иммуногенность, наличие иммунных инфильтратов, адаптивный иммунный ответ	Крайне низкое число ОАФ, низкая иммуногенность, врожденный иммунный ответ	Низкое число ОАФ, высокая иммуногенность, адаптивный иммунный ответ	Высокое число ОАФ, врожденный иммунный ответ, эпителиально-мезенхимальный переход
Гены с высокой частотой мутаций	<i>MSH6</i> , <i>RNF43</i> , <i>ATM</i> , <i>TGFBR2</i> , <i>BRAF</i> , <i>PTEN</i>	<i>APC</i> , <i>KRAS</i> , <i>TP53</i> , <i>PIK3CA</i>	<i>APC</i> , <i>KRAS</i> , <i>TP53</i> , <i>PIK3CA</i>	<i>APC</i> , <i>KRAS</i> , <i>TP53</i> , <i>PIK3CA</i>
Возраст	69	66	67	64
Пол	М ³ /Ж ⁴ : 44%/56%	М/Ж: 58%/42%	М/Ж: 53%/47%	М/Ж: 55%/45%
Локализация	Проксимальные отделы	Дистальные отделы	Проксимальные/дистальные отделы	Дистальные отделы

Стадия %				
I	12	13	17	8
II	44	40	41	33
III	40	39	37	47
IV	4	8	5	12
Степень дифференцировки %				
1	15	22	20	9
2	40	73	68	72
3	45	5	12	19

Примечания: CNV – copy number variation (изменение числа копий гена), ОАФ – опухоль-ассоциированные фибробласты, М – мужчины, Ж – женщины,

Клиническое приложение молекулярных CMS подтипов

CMS1. Пациенты данной группы с ранним РТК и MSI-H имеют лучший прогноз в сравнении с больными, чьи опухоли микросателлитно-стабильны [247], а в случае диагностирования на II стадии - имеют низкий риск рецидивирования и в большинстве случаев не нуждаются в адъювантной химиотерапии. При этом CMS1-опухоли ассоциированы с худшей выживаемостью после рецидива заболевания [84]. Больные с III стадией MSI-H РТК не отвечают на монотерапию 5-фторурацилом, но чувствительны к ПХТ (FOLFOX) [9, 237]. Вследствие высокой иммуногенности опухолей группы CMS1, иммунно-направленная терапия распространенного РТК является одним из приоритетных направлений лекарственного лечения с применением ингибиторов PD-1¹¹ (ниволюмаба, пембролизумаба) и PDL-1¹² (дюрвалюмаба) [123].

CMS2. В отличие от группы CMS1, опухоли подтипа CMS2 характеризуются преобладанием левостороннего поражения с относительно лучшим показателем медианы выживаемости после рецидива (35 мес.), тогда как в CMS1-группе это значение составляет 9 мес. [94].

Пятилетняя выживаемость для всех стадий РТК в CMS2-группе наилучшая в сравнении с другими группами и достигает 77% при 73%, 75% и 62% для CMS1,

¹¹ PD1 – programmed cell death 1 – мембранный белок надсемейства иммуноглобулинов, негативный регулятор иммунного ответа

¹² PDL1 – programmed cell death 1 ligand – лиганд мембранного белка надсемейства иммуноглобулинов

CMS3 и CMS4-групп, соответственно [94].

Около 39% опухолей CMS2-РТК диагностируется на III стадии заболевания, что предполагает адъювантное химиотерапевтическое лечение наряду с оперативным пособием.

CMS3. Сравнительный анализ для данной подгруппы показал, что *KRAS*-ассоциированные опухоли, а также их дистальное расположение ассоциированы с коротким безрецидивным периодом и плохим прогнозом [25]. Для метастатического РТК, высокая частота соматических мутаций в гене *KRAS* лимитирует возможные терапевтические возможности с применением ингибиторов EGFR (цетуксимаба и др.).

Перспективным направлением в лечении РТК с *KRAS*-мутациями и с гиперэкспрессией белка HER2, является применение тирозинкиназных ингибиторов (ТКИ) HER2, эффективность которых изучается в ряде клинических исследований, в т.ч. в комбинации с трастузумабом [128]. Соматические мутации в гене *HER2* определяют резистентность к *EGFR*-ТКИ, которая может быть преодолена назначением мультикиназных ингибиторов EGFR [128].

Как и большинство ЗНО, CMS3-РТК обладает т.н. «метаболическим фенотипом», при котором не удается выявить специфическую терапевтическую «генную» мишень. Ингибирование анаболического метаболизма в опухолевых клетках путем подавления активности цистатионин- β -синтазы (ЦБС) является одним из перспективных путей в лечении *KRAS*-позитивного РТК [50, 257].

CMS4. РТК с молекулярными характеристиками группы CMS4 часто диагностируется на поздних стадиях заболевания, имеет плохой прогноз с худшим показателем 5-летней общей и безрецидивной выживаемости. Несмотря на то, что адъювантная ПХТ для III стадии РТК рекомендовано в большинстве случаев, системное химиотерапевтическое лечение у пациентов с CMS4-РТК не улучшало показателей выживаемости [225]. При генерализации процесса, CMS4-РТК резистентен к лечению *EGFR*-ТКИ, независимо от статуса гена *KRAS*. Возможными опциями в лечении таких пациентов являются назначение ингибиторов ангиогенеза (бевацизумаб и др.) и моноклональных антител,

мишенями для которых служит опухолевое микроокружение. Так, абитузумаб, блокирующий поверхностный клеточный белок интегрин $\alpha\text{v}\beta\text{6}$, показал обещающие результаты в I/II фазе клинических испытаний [67].

Сравнительные данные исследований TCGA и CMS представлены на рисунке 2 [263].

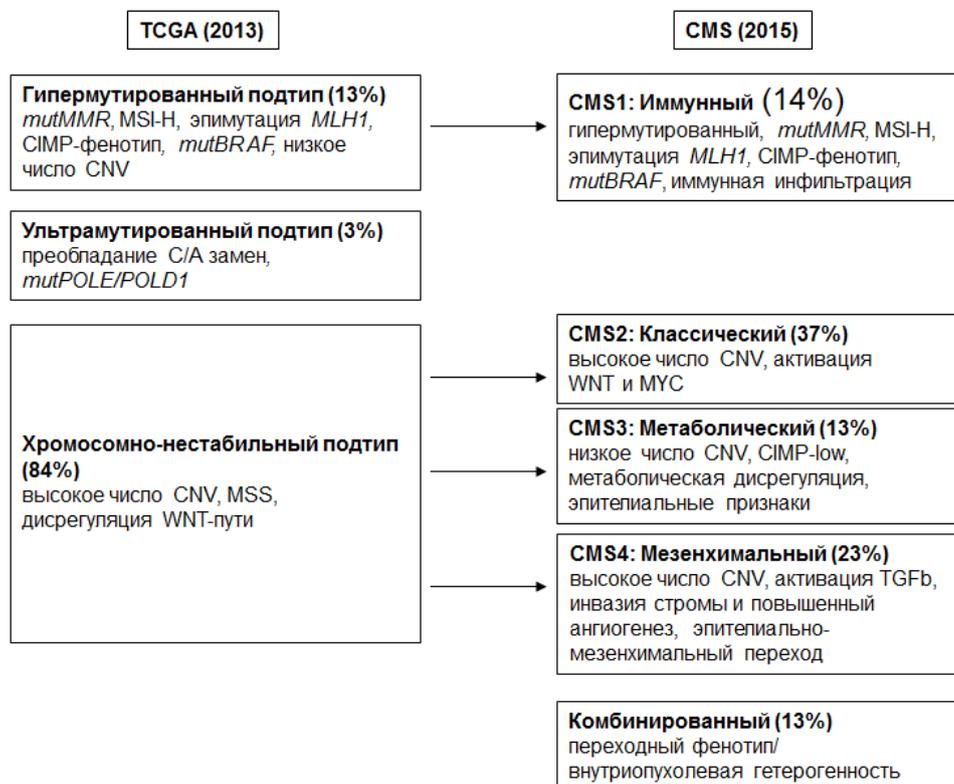


Рисунок 2 - Сравнительные данные молекулярных подтипов согласно классификациям TCGA и CMS.

На сегодняшний день ни одна из предложенных молекулярных классификаций РТК не рекомендована для внедрения в клиническую практику [185], в то время как отдельные диагностические компоненты такой стратификации являются одобренными и выполняются рутинно пациентам с метастатическим РТК (ДНК-тестирования генов *KRAS*, *NRAS* и *BRAF*, определение уровня экспрессии белков HER2-неу, PD1 и PDL1). Статус микросателлитной нестабильности является скрининговым тестом при подозрении на синдром Линча, а также при определении показаний для химиотерапии у пациентов со II стадией заболевания.

1.4. Роль соматических мутаций в генах MAPK-молекулярного сигнального пути

Изучение соматического профиля злокачественных новообразований толстой кишки позволило выделить ряд генов и молекулярных сигнальных путей, играющих важную роль в инициации и прогрессии РТК. За последние десятилетия фундаментальные и клинические исследования предиктивных и прогностических биомаркеров при РТК улучшили как непосредственные, так и отдаленные результаты лечения.

Одним из крупных исследований, посвященных изучению спектра молекулярной патологии РТК, явилась работа, выполненная под эгидой TCGA [42]. Экзомное секвенирование с оценкой вариаций числа генов, статуса метилирования, экспрессии РНК¹³ и микроРНК было выполнено для 276 образцов опухоли толстой кишки, полногеномное секвенирование – для 97 образцов РТК. В результате исследования отмечено значительное сходство в соматических паттернах опухолей ободочной и прямой кишки. Суммарно, гиперметилирование выявлено в 16% опухолей (в подавляющем большинстве случаев - аномальное метилирование и эпимутации гена *MLH1*), мутации в генах системы репарации неправильно спаренных оснований ДНК и гене *POLE* встречались в 25% случаев. Наиболее частые изменения амплификации затронули гены *ERBB2* и *IGF2*, являющиеся потенциальными мишенями для таргетной терапии. Среди хромосомных транслокаций доминировали перестроения с вовлечением *NAV2* и *TCF7L1*.

Всего в результате TCGA-исследования выявлены 32 гена с частыми соматическими мутациями. В опухолях с высокой мутационной активностью чаще всего изменения находили в генах *ACVR2A* (63 %), *APC* (51 %), *TGFBR2* (51 %), *BRAF* (46 %), *MSH3* (40 %), *MSH6* (40 %), *MYOBI* (31 %), *TCF7L2* (31 %), *CASP8* (29 %), *CDC27* (29 %), *FZD3* (29 %), *MIER3* (29 %), *TCERG1* (29 %), *MAP7* (26 %), *PTPN12* (26 %) и *TP53* (20 %). В группе с низким числом мутаций соматические события затрагивали гены *APC* (81 %), *TP53* (60 %), *KRAS* (43 %),

¹³ РНК – рибонуклеиновая кислота

TTN (31 %), *PIK3CA* (18 %), *FBXW7* (11 %), *SMAD4* (10 %), *NRAS* (9 %), *TCF7L2* (9 %), *FAM123B* (*WTX* (7 %)), *SMAD2* (6 %), *CTNNB1* (5 %), *KIAA1804* (4 %), *SOX9* (4 %), *ACVR1B* (4 %), *GPC6* (40 %) и *EDNRB* (3 %). В генах-супрессорах опухолевого роста *ATM* и *ARID1A* в подавляющем большинстве случаев выявлялись нонсенс- и мутации со сдвигом рамки считывания. Мутации в 12, 13 и 61 кодонах генов *KRAS* и *NRAS*, а также мутация V600E в гене *BRAF* были самыми частыми активирующими событиями, в то время как практически все остальные мутации в других генах носили характер инактивирующих.

Самыми частыми патогенетическими молекулярными путями, вовлеченными в канцерогенез РТК, являлись: активация WNT, MAPK и PIK3CA, «выключение» TGF- β и TP53 – сигнальных путей. WNT-сигнальный путь был активирован в 97% и 93% случаев для 1 и 2 TCGA-групп соответственно, включая биаллельную инактивацию гена *APC* и вовлечение в процесс гена *CTNNB1* в 80% опухолей. В MAPK и PI3K – сигнальных путях паттерны мутаций были в генах, взаимоисключающих друг друга (*RAS—BRAF*; *PIK3CA*, *PIK3R1—PTEN*). TGF- β -путь характеризовался изменениями в генах *TGFBR1*, *TGFBR2*, *ACVR2A*, *ACVR1B*, *SMAD2*, *SMAD3* и *SMAD4* в 27% в группе опухолей с низким уровнем и в 87% гиперметилированных РТК. Мутации в генах *TP53* и *ATM* встречались в 60% и 7% случаев соответственно и были главными событиями, вовлекающими TP53-сигнальный путь.

С 2004 г. таргетная терапия как в монорежиме, так и в комбинации со стандартными химиотерапевтическими препаратами расширила терапевтические возможности лечения РТК, особенно в прогностически неблагоприятной группе больных с распространенным процессом. ДНК-тестирование генов *RAS/BRAF* MAPK-молекулярного сигнального пути, активируемого через рецепторы факторов роста, является на сегодняшний день стандартом при лечении пациентов с метастатическим РТК. MAPK-сигнальный путь, мутации в котором выявляются в различных видах ЗНО, является одним из важных механизмов, регулирующих клеточный рост, дифференцировку и апоптоз [4].

К семейству генов *RAS*, подразделяющегося на ряд подсемейств и

кодирующим малые G-белки, GTPазы, относят 3 «классических» гена: *KRAS*, *NRAS* и *HRAS*. Два последних кодируют по одному белковому продукту, тогда как *KRAS* имеет две сплайсоформы. Белки семейства RAS обладают более 10 различных классов эффекторами. Большинство этих белков экспрессируется во всех типах клеток, и, таким образом, регулируют множество функций в любой клетке. В опухоли RAS приобретают особое значение: их активность ведет к неконтролируемой пролиферации, в частности, реализуемой через RAS-ERK-каскад [4].

Онкоген *KRAS* (*V-KI-RAS2 KIRSTEN RAT SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG*; *OMIM 190070*) представляет собой человеческий гомолог одноименного гена, выделенного из вируса саркомы Kirsten. Впервые ген *KRAS* описан в 1982 г. DeG и соавт. [59], клонирован в 1983 г. McGrath с и соавт. [167]. *KRAS* расположен на 12 хромосоме (2p12.1-p11.1.), состоит из 6 экзонов, кодирующими из которых являются 2, 3 и 4. В клетке участвует в регуляции клеточного цикла, пролиферации и механизмов старения.

KRAS является одним из самых частых активированных онкогенов в опухолях человека и задействован в канцерогенезе от 17 до 25% ЗНО [142]. В опухолях толстой кишки соматические мутации в гене *KRAS* – частые события в РТК с CIN, впервые были описаны Burner и Loeb в 1989 г. [35] и встречаются с частотой до 50%. Большинство активирующих мутаций (95%) определяются в 12 и 13, реже – в 61, 117 и 146 кодонах. В ряде исследований показано, что соматические мутации в гене *KRAS* ассоциированы с худшими показателями выживаемости, данная корреляция более очевидна для опухолей левой половины толстой кишки [248, 297].

Онкоген *NRAS* (*NEUROBLASTOMA RAS VIRAL ONCOGENE HOMOLOG OMIM 164790*) впервые описан в 1982 г. в клеточных линиях различных сарком, годом позднее выделен на 1 хромосоме, а в 1985 г. определена 7-экзонная структура гена [96, 161]. Частота выявления соматических мутаций в образцах РТК в гене *NRAS* составляет от 2 до 5%. По своей прогностической и предиктивной значимости ген *NRAS* близок к гену *KRAS* с вовлечением в

мутационный процесс аналогичных кодонов (12, 13, 61, 117 и 146) [73, 96].

Протоонкоген *BRAF* (*V-RAF MURINE SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG B1*, OMIM 164757) представляет собой гомолог птичьего протоонкогена *c-Rml*, кодирующего серин-треониновую киназу, расположенный на 7 хромосоме (7q34) и состоящий из 18 экзонов. Впервые выделен в 1990 г. Sithanandam и соавт. [250], а в опухолях толстой кишки описан Rajagopalan и соавт. в 2002 г. [216]. Доля соматических мутаций в гене *BRAF* в аденокарциномах толстой кишки составляет от 5 до 10% [129]. В подавляющем большинстве случаев (более чем в 90%) встречается мутация V600E [249], выявляемая в спорадических формах РТК с нестабильной системой репарации, ассоциированная с СІМР-фенотипом и зубчатым механизмом канцерогенеза, приводя к конститутивной активации MAPK-пути, повышению пролиферативной активности, ингибировании апоптоза и индуцированию механизмов клеточного «выживания», что потенцирует миграцию избыточного числа колоноцитов к эпителиальной поверхности с формированием характерного зубчатого очертания кишечных крипт [40, 168]. *BRAF*-мутации считаются иницирующим событием для развития зубчатых аденом (особенно аденом на широком основании) с частотой выявления от 70 до 81% по данным разных авторов [117, 253]. Причины преобладания в 600 кодоне замены валина на глутамин остаются неизученными. Рядом исследователей показано, что мутация V600E приводит к повышению киназной активности более чем в 500 раз, по сравнению с диким типом гена *BRAF*.

Изменения в гене *BRAF* чаще диагностируют у женщин и пациентов старшего возраста, в опухолях проксимальной локализации с низкой степенью дифференцировки и муцинозным гистотипом [129, 249]. Наличие патологического типа гена *BRAF* ассоциировано с неблагоприятным клиническим прогнозом, особенно в группе пациентов с распространенным процессом [73, 264].

Несмотря на то, что мутации в генах *BRAF* и *KRAS* выявляются в одноклеточных злокачественных новообразованиях, патологические *BRAF/ KRAS* генотипы считаются взаимоисключающими событиями, а их сочетание

встречается казуистически редко (в 0,001%) [233]. Так, в 2017 г. Vittal и соавт. представили клинический случай пациентки с диссеминированным РТК, в образце опухоли которой были выявлены мутации в генах *KRAS* (G12D) и *BRAF* (V600). Несмотря на проводимое химиотерапевтическое лечение (FOLFOX), было отмечено быстрое прогрессирование заболевания и смерть больной через три месяца после манифестации РТК [275]. В исследовании Seth и соавт. сочетание *BRAF/ KRAS*-мутаций было определено в одной клеточной линии РТК из 24 исследованных [241]. Три аналогичных случая выявлены в работе Sahin и соавт. В группу исследования вошли 6 333 образца опухолей толстой кишки, 644 из которых были положительны на *KRAS*-мутацию и три случая (0,2%) несли патологический *BRAF*-генотип [233].

Клиническая значимость *EGFR*, *NRAS*, *KRAS* и *BRAF* статуса

Гиперэкспрессия *EGFR* встречается в 49-82% случаев РТК, однако интенсивность иммуногистохимического окрашивания не коррелирует с ответом на терапию и не определяет эффективность применения цетуксимаба или панитумумаба, в связи с чем, рутинное *EGFR*-тестирование не показано пациентам с РТК [185]. По данным клинических исследований клинический ответ при назначении цетуксимаба или панитумумаба удается получить только у 10-20% больных [185].

Большое количество исследований посвящено предиктивному и прогностическому значению соматических мутаций в 12 или 13 кодонах 2 экзона, в 3 и 4 экзонах гена *KRAS*, а также в гене *NRAS*, определяющих неэффективность назначения цетуксимаба или панитумумаба [185].

Согласно рекомендациям ASCO в обновленной версии а Provisional Clinical Opinion Update расширенное тестирование соматических мутаций в гене *KRAS* рекомендуется всем пациентам с метастатическим РТК.

FDA (Food and Drug Administration) в аннотациях к цетуксимабу или панитумумабу также указывает на нерациональность назначения данных препаратов пациентам с мутациями в генах *KRAS/NRAS* [185].

Анализ ретроспективных данных позволил определить и соматические

мутации в гене *BRAF* как маркер резистентности к анти-EGFR-терапии при назначении второй и последующих линий ПХТ у пациентов с распространенным РТК [185].

В связи с тем, что анти-EGFR-терапия не показана пациентам с I, II, III стадиями заболевания, *RAS/BRAF*-генотипирование образцов РТК на ранних стадиях заболевания не рекомендуется [185].

Резюмируя выше сказанное, **согласно рекомендациям NCCN:**

- всем пациентам с метастатическим колоректальным раком должно проводиться ДНК-тестирование с целью определения соматических мутаций в генах *BRAF*, *NRAS* и *KRAS*;

- молекулярно-генетическая диагностика выполняется на образцах опухолевой ткани, фиксированной в парафине;

- исследование может быть выполнено как на образце первичной опухоли, так и на биоматериале из очага метастатического поражения;

- тестирование соматических мутаций в генах *BRAF*, *NRAS* и *KRAS* должно осуществляться в сертифицированных лабораториях;

- для проведения ДНК-диагностики может быть использован любой диагностический молекулярный метод (регламентированных диагностических методик нет);

- назначение цетуксимаба или панитумумаба пациентам с любой выявленной мутацией в генах *NRAS* и *KRAS* считается нецелесообразным;

- мутация V600E в гене *BRAF* не повышает вероятность ответа на лечение цетуксимабом или панитумумабом.

1.5 Наследственный рак толстой кишки

Наследственный фактор является одной из важных причин развития РТК. На долю наследственно-обусловленных форм злокачественных новообразований толстой кишки приходится от 2 до 5% [149]. В таких случаях РТК манифестирует в подавляющем большинстве случаев в молодом возрасте и встречается в составе высоко- и средне-пенетрантных наследственных синдромов [15]. Так, в исследовании Chang и соавт. в группе пациентов с РТК моложе 40 лет, доля

генетически-обусловленных ЗНО составила 22%, 17% из которых были обусловлены нарушениями в системе репарации неправильно спаренных оснований [48], что не противоречит результатам других крупных клинических исследований, в которых среди больных с манифестацией РТК до 40 - 45 лет на долю наследственной патологии приходилось около 15-20% [15, 245]. Кроме молодого возраста развития РТК пациенты с ранней манифестацией заболевания характеризуются клинико-патологическими и молекулярными характеристиками опухоли, отличающимися от таковых в группе пациентов с реализацией заболевания после 50 л. Основные отличия представлены в таблице 4 [15].

Таблица 4 - Основные клинико-молекулярные характеристики РТК в зависимости от возраста манифестации.

Клинические и молекулярные характеристики	РТК в возрасте до 50 лет	РТК в возрасте после 50 лет
Поражение проксимальных отделов толстой кишки		X
Поражение дистальных отделов толстой кишки	X	
Наличие первично-множественных опухолей толстой кишки	X	
Преобладание III-IV стадии на момент постановки диагноза	X	
Муцинозный/перстневидноклеточный/низкодифференцированный варианты РТК	X	
Преобладание опухолей с MSS	X	
MSI-H вследствие эпимутаций промотерной области гена <i>MLH1</i>		X
Наличие CIN		X
CIMP-Low	X	
CIMP-High		X
Микросателлитно- и хромосомностабильный РТК	X	
Гипометилирование LINE1	X	

В работе Lichtenstein и соавт. по изучению вклада экзогенных воздействий и генетически-опосредованных факторов в риск развития РТК на когорте пациентов из близнецовой пары, 35% случаев ЗНО толстой кишки были обусловлены наследственными причинами, внешние мутагенные факторы определили развитие РТК у 5% и у 60% больных определить ведущий причинный фактор не удалось [148]. На долю синдромальной патологии приходилось до 5% всех описанных случаев. На рисунке 3 представлена диаграмма распределения РТК в зависимости от доминирующего этиологического компонента [148].

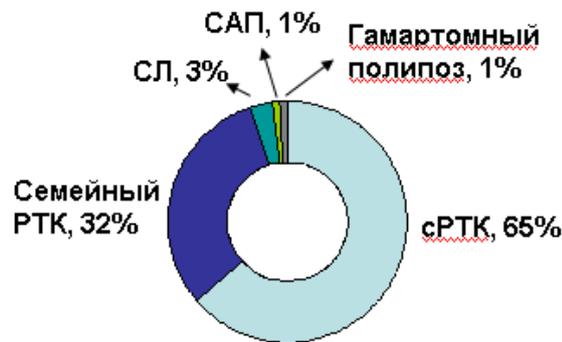


Рисунок 3 - Частота спорадических, семейных и наследственных форм РТК.

В многочисленных исследованиях показано, что у лиц, имеющих родственника первой степени родства (ПСР) с установленным диагнозом РТК, риск развития ЗНО толстой кишки возрастает в 2-3 раза, по сравнению с общей популяцией. Два пораженных родственника второй степени родства (ВСР) или один родственник ПСР с манифестацией заболевания в возрасте до 50 лет увеличивают риск РТК в 3 и более раз [37]. Риск РТК возрастает даже при наличии в семье случаев ЗНО толстой кишки во втором и третьем поколении. Родственник ПСР с аденоматозными полипами также повышает эмпирический риск РТК. Возраст диагностирования колоректального рака также влияет на соотношение шансов риска развития опухолей толстой кишки. Так, при выявлении РТК на девятом десятилетии жизни, риск аналогичного заболевания для родственника ПСР повышается в 1,5 раза, в то время как манифестация РТК в возрасте младше 45 лет коррелирует с 4-кратным и более повышением вероятности ЗНО толстой кишки [37]. В таблице 5 представлены рекомендации по наблюдению родственников ПСР пациентов с РТК в зависимости от градации

риска развития ЗНО толстой кишки [37].

Таблица 5 - Рекомендации по наблюдению родственников ПСР пациентов с РТК в зависимости от градации риска развития РТК.

Семейный анамнез	Риск РТК	Рекомендации по наблюдению
Неотягощен	6%	Начиная с 50 л.: - анализ кала на скрытую кровь ежегодно; - ректороманоскопия – каждые 5 л.; - ирригоскопия – каждые 5 л.; - колоноскопия – каждые 10 л.
Наличие одного родственника ПСР с РТК ≥ 50 л.	Повышен в 2-3 р.	Начиная с 40 л.: - анализ кала на скрытую кровь ежегодно; - ректороманоскопия – каждые 5 л.; - ирригоскопия – каждые 5 л.; - колоноскопия – каждые 10 л.
Наличие одного родственника ПСР с РТК < 50 л.	Повышен в 3-4 р.	Колоноскопия каждые 5 л. начиная с возраста 40 л. или на 10 л. раньше возраста манифестации РТК у родственника
Наличие родственников ВСР и ТСР* с РТК	Повышен в 1,5 р.	Начиная с 50 л.: - анализ кала на скрытую кровь ежегодно; - ректороманоскопия – каждые 5 л.; - ирригоскопия – каждые 5 л.; - колоноскопия – каждые 10 л.
Наличие одного родственника ПСР с аденоматозными полипами	Повышен ~ в 2 р.	Начиная с 50 л. (или с 40 л. в зависимости от семейной истории): - анализ кала на скрытую кровь ежегодно; - ректороманоскопия – каждые 5 л.; - ирригоскопия – каждые 5 л.; - колоноскопия – каждые 10 л.

Примечание - * - ТРС – третья степень родства.

Наследственный РТК можно подразделить на неполипозные и полипозные варианты, однако данное деление является крайне условным, т.к. любой опухоли толстой кишки наследственной природы предшествует полип (в последующем аденома). Термин неполипозный РТК для отличия от истинных форм семейного аденоматозного полипоза был предложен в 1984 г. [259]. По последним представленным данным наличие даже 24 полипов у пациента с синдромом Линча не противоречит природе данного заболевания [122]. В таблице 6 представлены основные синдромы наследственно-обусловленного РТК.

Таблица 6 - Наследственные синдромы, ассоциированные с РТК.

Синдром	Гены, ассоциированные с синдромом	Тип наследования	Риск РТК	Другие проявления в составе синдрома
Синдром Линча	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM</i>	Аутосомно-доминантный (АД)	50-80%	Рак тела матки, рак яичников, рак желудка, рак почки, рак мочеточника, рак тонкой кишки, опухоли желчевыводящих путей. Синдром Муир-Тор: кожные кератоакантомы, опухоли сальных желез. Синдром Тюрко: глиобластома.
Синдром конститутивного дефицита в системе репарации (синдром биаллельной инактивации генов системы репарации и неправильно спаренных оснований)	<i>MSH6, PMS2</i>	Аутосомно-рецессивный (АР)	80%	Опухоли головного мозга, рак тонкой кишки, полипы/аденомы толстой кишки и желудка, рак желудка, гемобластозы, рабдомиосаркома, опухоль Вильмса, нейробластома. Кожные проявления: пятна цвета «кофе с молоком».
Семейный аденоматозный полипоз	<i>APC</i>	АД	100%	Рак 12-перстной кишки, гепатобластома, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак желудка, опухоли головного мозга, десмоидные опухоли. Синдром Гарднера: остеомы, эпидермоидные кисты, врожденная гипертрофия пигментного эпителия сетчатки, полидонтия. Синдром Тюрко: медуллобластома.

Аттенуированный семейный аденоматозный полипоз	<i>APC</i>	АД	70-80%	См. семейный аденоматозный полипоз
MUTYH-ассоциированный полипоз	<i>MUTYH</i>	АР	-	Врожденная гипертрофия пигментного эпителия сетчатки, остеомы, зубные кисты, аденомы 12-перстной кишки, рак желудка.
Синдром Пейтца-Егерса	<i>STK11</i>	АД	39%	Голубо-коричневая пигментация вокруг рта, носа, глаз, а также на буккальной слизистой и пальцах в детском возрасте (бледнеет с возрастом). Полипоз верхних отделов ЖКТ*. Рак молочной железы, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак тонкой кишки, рак желудка, рак пищевода, опухоли из клеток Сертоли, опухоли гонад.
Синдром ювенильного полипоза	<i>BMPRIA, SMAD4</i>	АД	17-68%	Множественные гамартомные полипы толстой кишки, желудка, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак тонкой кишки.
Синдром Коудена	<i>PTEN</i>	АД	9%	Рак молочной железы, рак щитовидной железы, гамартомные полипы верхних отделов ЖКТ, макроцефалия, фиброзно-кистозная мастопатия, папилломы рта, трихилемомы, кератоз кистей и стоп, липомы.
Синдром зубчатого (гиперпластического) полипоза	<i>RNF43</i>	АД	>50%	Гиперпластические полипы, зубчатые аденомы толстой кишки

Семейный колоректальный рак тип X	<i>PLA2G2A, EXO1, DUSP10, ODC1, TGFB2, MF12, MYNN, TLR2, PKHD1, EIF3H, POU5F1P1, DQ515897, MYC, DQ515897, DQ486513, CB104826, POU5F1, TGFB1, PTCH, XPA, SYK, GALNT12, TLR4, CCND1, COLCA2, COLCA1, C11orf53, POU2AAF1, LARP4, DIP2B, ATF1, POLE, BRCA2, KLF5, KLF12, LMO7, C12orf17, SPRY2, GPC5, MYCBP2, POU4F1, BMP4, GOLGA5, GREM1, SCG5, CRAC1, FMN1, H1C1, CDH1, SMAD7, RHPN2, POLD1, BMP2, LA, MA5, CHEK2</i>	АД	RR=2.3	В зависимости от синдромальной патологии
Синдром, ассоциированный с мутациями и в генах <i>POLE, POLD1</i>	<i>POLE, POLD1</i>	АД	50-80%	Рак тела матки, аденоматозные полипы.
Синдром смешанного полипоза	<i>GREM1</i>	АД	-	Тубуло-ворсинчатые аденомы, зубчатые аденомы, полипы Пейтца-Йегерса, ювенильные полипы и др. Еврейская популяция.

Примечание - * - ЖКТ – желудочно-кишечный тракт.

К неполипозным вариантам наследственно-обусловленных форм РТК относят синдром Линча, синдром конститутивного дефицита в системе репарации (синдром биаллельной инактивации генов системы репарации неправильно спаренных оснований), линч-подобный синдром (соматическая биаллельная инактивация генов системы MMR), а также микросателлитно-стабильный синдром, ассоциированный с мутациями в генах *POLE, POLD1* и семейный колоректальный рак тип X [43].

1.5.1. Синдром Линча

Синдром Линча (СЛ (ОМIM 120435)) является самым частым высокопенетрантным наследственным онкологическим синдромом, ассоциированным с повышенным риском развития злокачественных

новообразований желудочно-кишечного тракта и, в первую очередь, РТК и рака эндометрия у женщин [37]. Впервые синдром описан в 1966 г. Линчем и соавт. [156]. Позже было предложено обозначение «неполипозный колоректальный рак» с целью дифференцирования данного состояния от полипозных вариантов РТК. В 1984 г. «синдром Линча» был окончательно закреплен для наименования данного состояния и используется по настоящее время в клинической практике [27]. Популяционные исследования в США показали, что примерно в 1 из 35 вновь зарегистрированных случаев РТК может быть диагностирован СЛ [300].

СЛ составляет 2-4% РТК и является синдромом, наследующимся по аутосомно-доминантному типу. РТК в составе СЛ характеризуется классическим вариантом развития злокачественной опухоли из предшествующей аденомы (тубулярной, villous или смешанной) с интервалом развития около 5 лет, в сравнении со спорадическим РТК, при котором среднее временное значение эволюции аденомы в рак составляет 10 лет [90]. Риск развития РТК в составе СЛ составляет 52-82% [29, 139]. Рак тела матки (РТМ) является второй самой частой злокачественной опухолью с 25-60% риском манифестации заболевания на протяжении жизни [139]. В структуре общей заболеваемости РТМ у женщин на долю Линч-ассоциированных форм приходится около 2% [98, 116]. Другие ЗНО, встречающиеся в составе синдрома Линча, представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Риск развития различных ЗНО в составе СЛ [адаптировано [184]].

ЗНО	Общепопуляционный риск	<i>MLH1/MSH2</i> [29, 139]		<i>MSH6</i> [13, 29]		<i>PMS2</i> [240]	
		Риск	Средний возраст манифестации	Риск	Средний возраст манифестации	Риск	Средний возраст манифестации
РТК	4,5%	52%-82%	44-61 л.	10%-22%	54 г.	15%-20%	61-66 л.
РТМ	2,7%	25%-60%	48-62 л.	16%-26%	55 л.	15%	49 л.
Рак желудка	<1%	8%-13%	56 л.	<3%	63 г.	+	70-78 л.
Рак яичников	1,6%	до 24% [29, 176]	43-45 л.	1% [29, 176]	46 л.	+ [176]	42 г.
ЗНО гепатобилиарной системы	<1%	1%-4%	50-57 л.	-	-	+	-

ЗНО мочевыводящей системы	<1%	1%-7% [121]	54-60 л.	<1%	65 л.	+	-
ЗНО тонкой кишки	<1%	3%-6%	47-49 л.	-	54 г.	+	59 л.
Опухоли головного мозга	<1%	1%-3%	~50 л.	-	-	+	45 л.
Опухоли сальных желез	<1%	1%-9%	-	-	-	-	-
Опухоли поджелудочной железы	<1%	1%-6% [126]	-	-	-	-	-

РТК как компонент СЛ характеризуется рядом клинических и морфологических черт [37, 116, 127, 184, 262, 285]:

- средний возраст развития РТК - 45-50 лет;
- тенденция к правосторонней локализации опухолевого поражения (в более молодом возрасте – поражение дистальных отделов и прямой кишки);
- высокий риск развития синхронных и метакронных ЗНО толстой кишки (16% и 41% к 10 г. и 20 г., соответственно, наблюдения после диагностирования первичной опухоли);
- наличие единичных аденом толстой кишки (единичные полипы, как правило, не более 10);
- низкая степень дифференцировки опухоли;
- наличие муцинозного компонента и перстневидных клеток;
- лимфоцитарная инфильтрация опухоли.

В 1990-х гг. герминальные мутации в системе генов MMR впервые описаны как этиологический фактор развития СЛ [34, 72, 186]. Основными генами, вовлеченными в процесс репарации неправильно спаренных оснований, являются гены *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, наследуемые мутации в которых наряду с потерей экспрессии гена *MSH2* вследствие протяженных делеций в гене *EPCAM*,

задействованы в канцерогенезе ЗНО у пациентов с СЛ [267]. Примерно в 90% случаев патологические изменения затрагивают гены *MLH1* и *MSH2*, в 6% - *MSH6*, гораздо реже в генах *PMS2* и *EPCAM*. В зависимости от генотипа риски развития ЗНО в составе СЛ разнятся. Так, герминальные мутации в гене *MSH6* ассоциированы с меньшим риском развития РТК и более высоким риском РТМ по сравнению с изменениями в генах *MLH1* и *MSH2* [13, 29]. Наиболее показательны различия для носителей патологического генотипа в гене *PMS2*, риск РТК в данном случае не превышает 15-20%, риск РТМ – 15% [240].

Совокупность анамнестических, клинических и морфологических данных позволяет на первичном этапе идентифицировать пациентов с формально-генетическим диагнозом – СЛ. Согласно разработанным международным критериям «Амстердам II» СЛ может быть заподозрен у пациента, страдающего РТК или любой другой/другими ЗНО в составе СЛ (РТМ, рак тонкой кишки, рак мочеточника, рак почки), при наличии не менее трех пораженных родственников с ЗНО из спектра СЛ, а также [184, 273]:

- Наличие одного пораженного родственника ПСТР;
- Накопление ЗНО не менее чем в двух поколениях;
- Наличие не менее одного родственника с ЗНО из спектра СЛ с манифестацией заболевания в возрасте до 50 л.;
- Все ЗНО должны быть верифицированы морфологически;
- Семейный аденоматозный полипоз должен быть исключен.

Примерно в 50% случаев у пациентов с подозрением на СЛ при клинико-анамнестическом соответствии критериям «Амстердам II» будет выявлен герминальный дефект в системе MMR-генов. Согласно последним представленным статистическим данным, 68% больных с СЛ будут пропущены на додиагностическом этапе в связи их несоответствием критериям «Амстердам II» [18, 185].

Патологические изменения в системе MMR приводят к появлению микросателлитной нестабильности, характеризующегося изменением числа микросателлитных повторов в опухолевой ткани. MSI играет важную роль в

регуляции клеточного цикла, дифференцировки, апоптоза и ответа на различные химиотерапевтические препараты. Более чем в 95% случаев РТК в составе СЛ характеризуется высоким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI-High), тогда как в спорадических опухолях этот показатель составляет 15% [267]. Диагностическое значение статуса MSI-Low остается неясным, часто этот показатель встречается при соматической инактивации гена *MSH3* [101].

Иммуногистохимическая оценка образцов опухоли РТК позволяет выявлять отсутствие или снижение экспрессии генов системы MMR, при этом часто диагностируется сочетанное «выключение» *MSH2* с *MSH6*, либо *MLH1* с *PMS2*. Изолированная потеря экспрессии *MSH2*, *MSH6* и *PMS2* является вероятным следствием герминальных мутаций в этих генах и специфична для СЛ. Изменение экспрессии гена *MLH1* в 12% спорадических форм РТК может быть обусловлено метилированием его промотерной области, ассоциировано с CIMP-фенотипом и соматическими мутациями в гене *BRAF*, наличие которых ставит под сомнение диагноз СЛ у пациента.

С целью повышения эффективности клинического отбора пациентов с подозрением на СЛ были разработаны, позже пересмотрены и дополнены рекомендации Бетезда [271], согласно которым ИГХ¹⁴-исследование с целью оценки экспрессии генов системы MMR или анализ статуса MSI, должно выполняться в случаях:

- РТК, диагностированного в возрасте моложе 50 лет,
- синхронного, метахронного первично-множественного РТК или сочетания РТК с другими ЗНО из спектра СЛ;
- РТК с гистологическими особенностями у пациента в возрасте до 60 лет: наличием лимфоцитарной инфильтрации, кроно-подобным фенотипом, муцинозной или перстневидно-клеточная дифференцировки, медулярным вариантом рака;
- Пациента с РТК и отягощенным семейным анамнезом: наличием родственника, страдавшего ЗНО из спектра СЛ в возрасте до 50 лет, либо одного

¹⁴ ИГХ – иммуногистохимическое исследование

родственника с линч-ассоциированным заболеванием независимо от возраста манифестации ЗНО.

Являясь более чувствительными, чем Амстердамские, рекомендации Бетезда, однако, не позволят отобрать для дальнейшей диагностики 50% больных с СЛ [184]. В одном из исследований герминальные мутации в генах *MLH1* и *MSH2* были выявлены только в 65% случаев РТК, соответствовавших критериям Бетезда [215].

Разработаны также статистические модели, определяющие риск диагностирования СЛ у пациентов. К ним относятся: PREMM5 [214], MMRpredict [213] и MMRpro [173].

В 2016 г. в обновленных рекомендациях NCCN был предложен универсальный скрининг СЛ во всех вновь диагностированных случаях РТК с оценкой статуса MSI или экспрессии системы генов MMR при ИГХ-исследовании [184].

Тактика наблюдения пациентов-носителей герминальных мутаций в генах системы MMR, включает:

- 1) Профилактику и раннюю диагностику РТК:
 - Колоноскопия каждые 1-2 года или на 2-5 лет ранее возраста манифестации заболевания у родственника с РТК;
 - Расширенные операции (колэктомии) могут быть рассмотрены у пациентов с РТК в молодом возрасте (до 50 лет) при невозможности динамического контроля (колоноскопии);
- 2) Профилактику и раннюю диагностику ЗНО желудка и тонкой кишки:
 - Гастродуоденоскопия с визуализацией 12-перстной кишки при колоноскопии каждые 3-5 лет с 30-35 летнего возраста при наличии отягощенного семейного анамнеза по ЗНО желудка и тонкой кишки;
- 3) Профилактику и раннюю диагностику уротелиального рака:
 - Общий анализ мочи с 30-35 летнего возраста при наличии отягощенного семейного анамнеза по ЗНО почек и уротелиального тракта, особенно у носителей мутаций в гене *MSH2*;

- 4) Профилактику и раннюю диагностику опухолей ЦНС:
 - Консультация невролога с 25-30 лет;
- 5) Профилактику и раннюю диагностику рака тела матки:
 - УЗИ органов малого таза/биопсия каждые 1-2 года;
 - Гистерэктомия (возраст выполнения профилактической гистерэктомии варьирует и зависит от генетического дефекта, семейной истории, сопутствующей патологии, репродуктивного потенциала пациентки);
- б) Профилактику и раннюю диагностику рака яичников:
 - УЗИ органов малого таза/биопсия каждые 1-2 года;
 - Анализ крови на опухолевые маркеры (СА125);
 - Билатеральная сальпингоовариэктомия (возраст выполнения профилактической гистерэктомии варьирует и зависит от генетического дефекта, семейной истории, сопутствующей патологии, репродуктивного потенциала пациентки);

Эффективных профилактических и диагностических мероприятий, направленных на раннее и своевременное выявление рака молочной железы и рака поджелудочной железы в составе СЛ, не разработано.

1.5.2. Наследственный полипозный рак толстой кишки

Морфологическая верификация полипоза наряду с внекишечными клиническими проявлениями и анализом семейной истории позволяет уже на первом диагностическом этапе поставить формально-генетический диагноз наследственно-обусловленного РТК. На рисунке 4 представлена схема соотношения различных вариантов полипоза с синдромальной патологией.

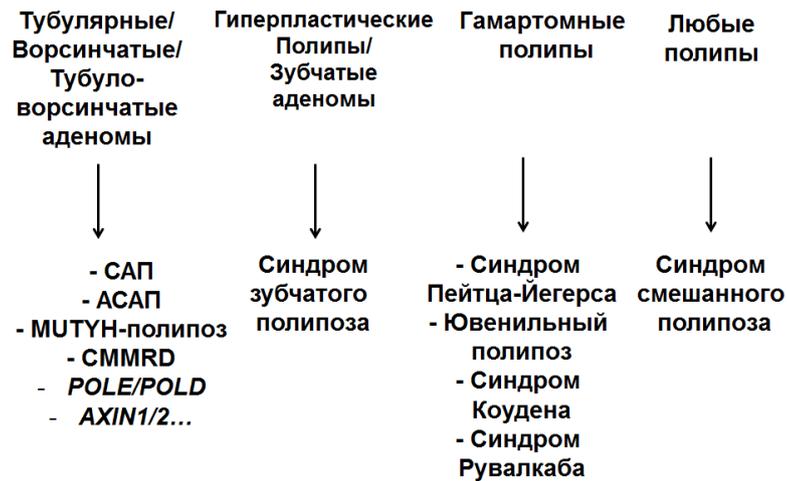


Рисунок 4 - Структура наследственного полипозного РТК.

Самым частым вариантом наследственного полипозного РТК является синдром семейного аденоматозного полипоза и его аттенуированная форма. Синдромы зубчатого и смешанного полипоза, а также крайне гетерогенная группа наследственных заболеваний, ассоциированных с гамартомными полипами, встречаются гораздо реже и в совокупности определяют не более 1% случаев РТК.

Семейный аденоматозный полипоз (САП) (OMIM 175100) является вторым по частоте встречаемости высокопенетрантным онкологическим синдромом в группе наследственно-обусловленных форм РТК, наследуется по аутосомно-доминантному типу и ответственен за 1% всех случаев ЗНО толстой кишки [116].

Первые случаи САП были опубликованы еще в 1847 г. [38]. Bussey в 1979 г. описал клиническую характеристику и природу синдрома [38]. Характерной чертой САП является развитие множественных полипов толстой кишки (от десятков до нескольких тысяч) с манифестацией полипоза уже в подростковом возрасте и практически 100% риском развития РТК. Средний возраст манифестации ЗНО толстой кишки в составе синдрома САП составляет 39 лет, при этом у 7% пациентов заболевание реализуется к 21 году, у 50% - к 39 годам и у 95% - к 50 годам [15, 37, 184, 262]. РТК в составе САП чаще диагностируется в левой половине толстой кишки.

К внекишечным фенотипическим проявлениям САП относят:

- полипозное поражение желудка (присутствуют более чем в 50% случаев; риск малигнизации не превышает 1% [37]);
- полипозное поражение 12-перстной кишки и тонкой кишки (встречается в 90 и 50% случаев, соответственно; вероятность озлокачествления 4-12% [37]);
- остеомы (чаще черепа и нижней челюсти), одонтомы, эпидермоидные кисты, десмоидные опухоли (встречаются в 20% случаев);
- врожденную гипертрофию пигментного эпителия сетчатки (ВГПЭС);
- полидонтию;
- рак щитовидной железы, рак поджелудочной железы, медуллобластомы, ЗНО печени (гепатобластомы манифестируют в первые пять лет жизни) и желчевыводящих путей (риск развития 1-2%).

Сочетание полипозного поражения толстой кишки с различными внекишечными проявлениями на фоне САП, такими как остеомы, эпидермоидные кисты, ВГПЭС, полидонтия и др., принято относить к синдрому Гарднера (по имени автора, описавшего семью с данной синдромальной патологией в 1951 г. [81]).

В 1991 г. была определена молекулярная природа САП [91]. Герминальные мутации в гене-супрессоре опухолевого роста *APC* (OMIM 5q21-22) являются этиологическим фактором развития САП. Отягощенный семейный анамнез отмечается в большинстве случаев, однако у 25-30% пациентов определяется герминальный дефект *de novo*¹⁵ [37, 124, 187]. Подавляющее число мутаций приводят к формированию преждевременного стоп-кода (нонсенс – и мутации со сдвигом рамки считывания) [15]. В 10-15% *APC*-негативных случаев классический фенотип САП обусловлен протяженными делециями в этом гене либо в локусе расположения *APC* на 5 хромосоме [187].

Показаниями для ДНК-тестирования с целью исключения герминальных мутаций в гене *APC* при полипозном поражении толстой кишки являются [124, 184]:

¹⁵ De novo – герминальная мутация, возникшая впервые у одного из членов семьи

- Одновременное выявление 10 аденоматозных полипов при колоноскопии;
- Наличие у пациента 10 полипов и морфологически верифицированного РТК в анамнезе;
- Диагностирование более 20 аденоматозных полипов на протяжении жизни;
- Ранее выявленная герминальная мутация в гене *APC* в семье.

При определении показаний для ДНК-тестирования также учитываются анамнестические данные больных, а именно, наличие десмоидных образований, гепатобластомы, папиллярного рака щитовидной железы, ВГПЭС и других клинических проявлений САП.

В исследовании, включившем более 7 000 пациентов с различными вариантами полипозного поражения толстой кишки, частота выявления патогенных мутаций в гене *APC* составила 80%, 56%, 10% и 5% при наличии у пациента более 1000, от 999 до 100, от 99 до 20 и от 19 до 10 аденом, соответственно [92]. Классический вариант САП подразумевает диагностирование у пациента более 100 полипов в молодом возрасте. Меньшее число полипов встречается в более раннем возрасте у носителей мутаций в гене *APC*, либо в случае аттенуированной формы САП.

Степень полипозного поражения толстой кишки, а также частота выявления некоторых внекишечных проявлений САП, коррелирует с локализацией мутаций в гене *APC* [187]. Так, герминальные мутации в гене *APC* до 157 кодона, а также после 1 595 кодона и в сайте альтернативного сплайсинга 9 экзона характерны для аттенуированных форм САП (менее 100 полипов). Множественный полипоз (тысячи полипов) ассоциирован с мутациями между 1 250 и 1 464 кодонами. Число полипов от 100 до 1 000 – промежуточная форма САП – определяется изменениями на неперечисленных выше участках гена *APC*. ВГПЭС чаще встречается при локализации мутаций между 311-1 444 кодонами, десмоидные опухоли - до 1 444 кодона. ЗНО верхних отделов ЖКТ диагностируют с повышенной частотой до 1 395 кодона, однако описаны случаи и при других

экзонных локализациях [187].

Рекомендации по наблюдению пациентов с САП

1) Наблюдение здоровых носителей герминальных мутаций в гене *APC* следует начинать с возраста 10-15 лет. Ежегодная колоноскопия является приоритетным методом исследования для оценки степени полипозного поражения толстой кишки и ранней диагностики злокачественного поражения. Принимая во внимание риск развития РТК на фоне САП, профилактическое хирургическое лечение может быть рассмотрено на втором десятилетии жизни пациентов [184]. При классическом варианте САП тотальная колпроктэктомия является наиболее оптимальным вариантом оперативного вмешательства, нивелируя риски по ЗНО и ободочной, и прямой кишки. Время выполнения профилактических операций зависит от возраста манифестации полипоза, его степени, тяжести клинической картины заболевания у пораженных родственников и генотипических особенностей у пациента.

Для пациентов, перенесших оперативное лечение на толстой кишке, частота эндоскопических исследований сохранных отделов ободочной кишки и/или прямой кишки варьирует от 6 до 12 месяцев в зависимости от степени полипоза. После колопроктэктомии эндоскопическая оценка состояния илеорезервуарного анастомоза или илеостомы выполняется 1 раз в 1-3 года, учитывая полипозный фон. Аденомы с высокой степенью дисплазии или аденомы на широком основании с villous гистологией повышают частоту наблюдения до 1 раза в 6 месяцев.

В зависимости от степени полипозного поражения, временной интервал выполнения эндоскопического исследования (ЭИ) составляет:

- стадия 0 (отсутствие полипов) – ЭИ каждые 4 года;
- стадия I минимальный полипоз (1-4 тубулярные аденомы (ТА) размером 1-4 мм) - ЭИ каждые 2-3 года;
- стадия II незначительный полипоз (5-19 ТА размером 5-9 мм) - ЭИ каждые 1-3 года;

- стадия III умеренный полипоз (≥ 20 ТА или размер ТА более 1 см) - ЭИ каждые 6-12 мес.;
- стадия IV выраженный полипоз или дисплазия тяжелой степени - ЭИ каждые 3-6 мес., хирургическое лечение в зависимости от клинической картины заболевания.

2) ЭГДС¹⁶ с визуализацией ампулы Фатерова сосочка выполняется всем пациентам, носителям герминальных мутаций в гене *APC*, начиная с возраста 20-25 лет. Если колэктомия была выполнена до 20 лет, профилактическое эндоскопическое исследование верхних отделов ЖКТ также рекомендуется начинать с более раннего возраста.

3) Ежегодное УЗИ¹⁷ щитовидной железы рекомендуется включать в план динамического наблюдения с позднего подросткового возраста.

4) Профилактические мероприятия, направленные на раннее выявление опухолевого поражения головного мозга, не регламентированы при САП. Рекомендуются ежегодное комплексное обследование и консультация врача-невролога. В составе САП чаще диагностируют медуллобластомы, в подавляющем большинстве у женщин в возрасте до 20 лет.

5) При наличии в семейном анамнезе случаев десмоидных опухолей на фоне САП, пациентам может быть предложено МРТ¹⁸ брюшной полости (с/без контрастирования) или КТ с контрастом в первые три года после хирургического вмешательства на толстой кишке с последующим повторением исследований каждые 5-10 л. Частота и объем диагностических исследований возрастают при наличии жалоб и подозрении на десмоидное образование у пациента. Рекомендуется дополнительная визуализация тонкой кишки при КТ или МРТ с целью исключения десмоидного поражения, особенно при полипозном поражении 12-перстной кишки.

6) УЗИ печени с оценкой уровня АФП¹⁹ в крови показаны детям в первые 5

¹⁶ ЭГДС – эзофагогастродуоденоскопия

¹⁷ УЗИ – ультразвуковое исследование

¹⁸ МРТ – магнитно-резонансная томография

¹⁹ АФП – альфа-фета протеин

лет жизни с частотой каждые 3-6 месяцев с целью своевременного выявления гепатобластомы. Несмотря на невысокий 1,5% риск развития заболевания, летальность при поражении печени составляет ~25% [184].

Аттенуированная форма САП (АСАП)

АСАП характеризуется более мягким течением заболевания, менее выраженным полипозом (10-100 аденом, в среднем ~30) и более поздней манифестацией заболевания [124, 184]. Аденоматозные полипы чаще локализуются в правых отделах толстой кишки и могут принимать форму зубчатых аденом на широком основании небольших размеров [36, 184].

Фенотипические проявления АСАП достаточно variabelны. Средний возраст диагностирования РТК составляет 50 лет, характерен резкий подъем заболеваемости после 40 лет, при этом риск РТК приближается к 70% к 80-летнему возрасту. Повышенные риски развития других ЗНО (рак щитовидной железы, рак 12-перстной кишки), а также поражение верхних отделов ЖКТ при АСАП схожи с таковыми при классической форме САП. В то время как внекишечные проявления (включая ВГПЭС и десмоидные опухоли) встречаются гораздо реже [184].

Молекулярная природа АСАП обусловлена герминальными мутациями в гене *APC*, при этом по аналогии с САП, в 30% случаев встречаются мутации *de novo*.

Клиническое наблюдение пациентов с АСАП при «здоровом» носительстве *APC*-мутаций в возрасте до 21 года и незначительном полипозе толстой кишки (до 20 аденом) сводится к колоноскопии с полипэктомией с периодичностью раз в 1-2 года. Возраст постановки на диспансерный учет и начала выполнения эндоскопических исследований приходится на поздний подростковый период. В группе больных старше 21 года при нарастании тяжести полипозного поражения и невозможности их подслизистого удаления рассматриваются расширенные хирургические вмешательства (проктоколэктомия и колэктомия). С целью мониторинга вторых первичных опухолей при АСАП рекомендуется ежегодное УЗИ щитовидной железы и ЭГДС аналогично САП [184].

1.6. Мультигенные таргетные панели в диагностике наследственных форм рака толстой кишки.

Картирование новых генов-кандидатов и расширение перечня наследственно-обусловленной патологии обуславливают большие потребности в ДНК-диагностических технологиях. Современные возможности молекулярно-генетического тестирования расширяют диагностический дифференциальный поиск при уменьшении времени исследования, интенсификации пробоподготовки, автоматизации и унификации процесса. Секвенирование нового поколения позволяет оценивать первичную структуру одновременно от нескольких генов до целого генома. Таргетное секвенирование с применением мультигенных панелей направлено на поиск изменений в клинически значимой части генома и является одним из важных инструментов в молекулярно-генетической диагностике наследственных заболеваний, в патогенез которых вовлекаются несколько генов [184].

На сегодняшний день разработаны, валидированы и внедрены в клиническую практику мультигенные панели, включающие широкий перечень генов, вовлеченных в канцерогенез наследственных форм РТК. Данный подход является оправданным при отрицательном первичном скрининговом исследовании на предмет наличия герминальных мутаций в наиболее вероятных генах-кандидатах, а также при невыраженной клинической картине заболевания, когда возможность определить ведущую синдромологическую принадлежность, а значит определить наиболее вероятную мишень для ДНК-диагностики, не представляется возможным. В указанных случаях данный подход является также и более экономически целесообразным [80]. Коммерческие таргетные панели широко варьируют в числе исследуемых генов, методиках подготовки библиотек и используемых платформах.

Главной дилеммой в применении NGS остаются лимитированные данные по интерпретации результатов и оценке риска, ассоциированного с выявленными изменениями, ввиду низкой встречаемости генетически-детерминированных форм ЗНО. Многие панели включают гены средней и низкой пенетрантности, для

которых оценка прогностической значимости выявленных вариантов еще более затруднена. Детекция мутаций в нескольких генах, модифицирующих риски, также является одной из трудностей, с которой приходится сталкиваться клиницистам при определении стратегии диагностики, лечения и профилактики [28].

В 17-38% тестирований с применением NGS выявляются варианты с неизвестным клиническим значением (т.н. VUS – variants with unknown significance) [97, 278]. Однако, в связи с всевозрастающим числом проводимых исследований с применением технологий NGS, ожидаемое число VUS будет постепенно снижаться в последующие годы. Не менее важной проблемой остается пропуск мутаций в процессе высокопроизводительного секвенирования, которые потенциально могут быть диагностированы стандартными методами [164].

Согласно рекомендациям NCCN и ASCO молекулярно-генетическое тестирование с применением мультигенных панелей должно проводиться только после первичного медико-генетического консультирования с последующим повторным обращением к врачу-генетику при получении результатов генотипирования [184, 223]. В случае нРТК показаниями для проведения такого тестирования являются:

- соответствие клинической картины заболевания и семейной истории более чем одному наследственному онкологическому синдрому (СЛ и *BRCA*-ассоциированный РМЖ/РЯ);
- полипоз толстой кишки неизвестной этиологии;
- аденоматозный полипоз (соответствующий патологическому *APC*, *MUTYH*, *POLE*, *POLD1* - фенотипу);
- семейный анамнез не соответствует ни одному известному наследственному состоянию;
- неизвестный семейный анамнез;
- наличие неубедительного результата первичного ДНК-диагностического теста [184].

Мультигенное тестирование не рекомендуется при наличии в семье ранее

подтвержденного носительства герминальных мутаций, ассоциированных с нРТК, а также в случае полного клинического и анамнестического соответствия критериям известного наследственного синдрома [184]. В таблице 8 представлены гены-кандидаты, включаемые в панели для таргетного секвенирования при нРТК.

Таблица 8 - Гены-кандидаты, включаемые в панели для таргетного секвенирования при нРТК [адаптировано [184]].

Ген	Степень достоверности	Риск РТК	Ассоциированные состояния
<i>APC</i>	Высокая	Высокий	САП, АСАП
<i>APC I1307</i>	Высокая	Промежуточный	РТК (высокая частота носительства среди евреев-Ашкенази)
<i>ATM</i>	Средняя/низкая	Неизвестный (чаще – промежуточный)	Рак молочной железы, РТК
<i>AXIN</i>	Средняя/низкая	Неизвестный (высокий – по данным ряда авторов)	Полипоз и олигодонтия
<i>BLM</i> (гетерозиготное носительство)	Средняя/низкая	Неизвестный (ни в одном исследовании - низкий)	РТК
<i>BMPRI1A</i>	Высокая	Высокий	Синдром ювенильного полипоза
<i>CHEK2</i>	Средняя/низкая	Промежуточный	Рак молочной железы, РТК и др.
<i>EPCAM</i>	Высокая	Высокий	СЛ
<i>GALNT12</i>	Средняя/низкая	Неизвестный (чаще – промежуточный)	РТК
<i>GREM1</i>	Средняя/низкая	Неизвестный (высокий – по данным ряда авторов)	Смешанный полипоз вследствие 40kb-дупликации только у евреев-Ашкенази
<i>MLH1</i>	Высокая	Высокий	СЛ
<i>MSH2</i>	Высокая	Высокий	СЛ
<i>MSH6</i>	Высокая	Высокий	СЛ
<i>MSH3</i>	Средняя/низкая	Неизвестный (высокий – по данным ряда авторов)	Олигополипоз
<i>MUTYH</i> (биаллельная инактивация)	Высокая	Высокий	<i>MUTYH</i> -ассоциированный полипоз
<i>MUTYH</i> (гетерозиготное носительство)	Средняя/низкая	Неизвестный (чаще – промежуточный)	РТК
<i>NTHL1</i>	Средняя/низкая	Неизвестный (высокий – по данным ряда авторов)	Полипоз
<i>POLD1</i>	Средняя/низкая	Неизвестный (высокий – по данным ряда авторов)	<i>POLD1</i> -ассоциированный полипоз

<i>POLE</i>	Средняя/низкая	Неизвестный (высокий – по данным ряда авторов)	<i>POLE</i> -ассоциированный полипоз
<i>PMS2</i>	Высокая	Высокий	СЛ
<i>PTEN</i>	Высокая	Промежуточный-высокий	Синдром Коудена/ <i>PTEN</i> -ассоциированные состояния
<i>SMAD4</i>	Высокая	Высокий	Синдром ювенильного полипоза
<i>STK11</i>	Высокая	Высокий	Синдром Пейтца-Йегерса
<i>TP53</i>	Высокая	Высокий	Синдром Ли-Фраумени

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы исследования и их характеристика

В исследование включены 365 пациентов с морфологически верифицированным диагнозом РТК, которые проходили обследование и/или находились на лечении в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 1972 по 2018 гг. Для достижения цели исследования сформирована статистическая база данных. Все пациенты стратифицированы на две исследовательские группы. В первую спорадическую группу включены 140 больных генерализованным РТК: пациенты с IV стадией РТК на момент манифестации заболевания и больные локализованным РТК с возвратом болезни (локарецидивом или отдаленными метастазами). В качестве биологического материала выступали образцы опухолевой ткани из первичного или метастатического очагов для больных IV стадией РТК и из рецидивной опухоли и/или очага вторичного поражения для пациентов с рецидивом/прогрессированием основного заболевания после окончания или во время специфического лечения. В данной группе всем больным оценен соматический профиль опухоли (соматические мутации в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* и статус MSI) с ретроспективным анализом амбулаторных и стационарных историй болезни.

Вторая герминальная группа объединила 143 пациента с формально-генетическим диагнозом наследственного рака толстой кишки в составе синдрома Линча (при соответствии пересмотренным рекомендациям Бетезда) или семейного аденоматозного полипоза при наличии более 20 полипов в толстой кишке. Для последующего клинко-морфологического сравнительного анализа была сформирована неотобранная контрольная группа больных РТК, включившая 82 больных с верифицированным диагнозом колоректального рака. В качестве объекта исследования выступили образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов периферической венозной крови больных РТК. В герминальной группе выполнялось ДНК-генотипирование на предмет наличия герминальных мутаций в

генах *MLH1* (1-19 экзоны; RefSeq ENST00000231790.2), *MSH2* (1-16 экзоны, RefSeq ENST00000233146.2) и в гене *APC* (1-15 экзоны, RefSeq ENSG00000134982). Для больных наследственным неполипозным раком толстой кишки также оценивались показатель MSI и статус гена *BRAF* в образце опухолевой ткани, для больных САП – соматический статус гена *KRAS*. Медико-генетическое консультирование проведено всем больным с подозрением на наследственно-обусловленный РТК на базе научно-консультативного отделения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Для выполнения сравнительного анализа клинично-морфологических данных больных с синдромом Линча и спорадическими формами неполипозного РТК сформирована контрольная группа больных (n=82), критериями включения в которую являлись: больные с гистологически верифицированным РТК с отсутствием микросателлитной нестабильности (MSS-статус) и/или наличием *BRAF*-мутации в образце опухоли в случае MSI-High, для двух больных с высоким уровнем MSI и *wtBRAF* дополнительно проведено *MLH1/MSH2*-генотипирование (возрастные и другие клинично-анамнестические данные не учитывались при отборе больных для включения в контрольную группу).

Дизайн исследования представлен на рисунке 5.

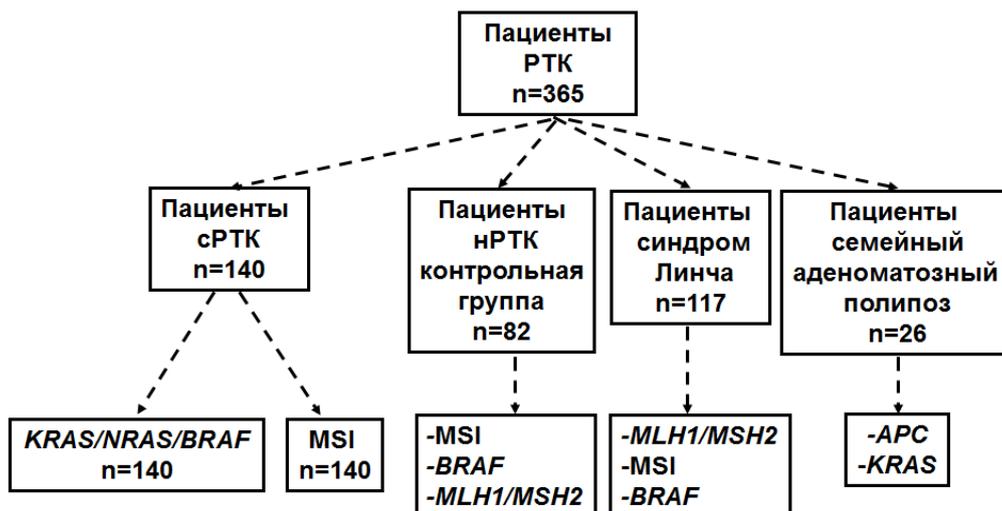


Рисунок 5 – Дизайн исследования.

Характеристика спорадической группы. В исследование включены 69 мужчин (49,3%) и 71 женщина (50,7%). Средний возраст на момент постановки

диагноза РТК составил $55,2 \pm 1,16$ лет (26-89 лет; ≤ 44 лет – 25% (n=35), 45-59 лет – 28,6% (n=28,6), ≥ 60 лет – 46,4% (n=65)). В большинстве случаев опухоль локализовалась в левой половине ободочной кишки и прямой кишке – 75,7% (n=106). Частота поражения отдельных участков толстой кишки представлены на рисунке 6.



Рисунок 6 - Частота поражения отдельных участков толстой кишки в группе спорадического РТК.

Среди гистологических вариантов доминировала аденокарцинома кишечного типа (83,6% (n=117)), реже встречались муцинозная аденокарцинома (8,6% (n=12)), нейроэндокринный (2,1% (n=3)) и перстневидноклеточный (0,7% (n=1)) типы рака. Наличие муцинозного компонента и перстневидных клеток выявлено в 12,9% случаев (n=18), лимфоплазмозитарной инфильтрации – у 2,1% больных (n=3). Умеренная степень дифференцировки отмечена в 60,7% опухолей (n=85), низкая – в 19,3% (n=27) и высокая - в 5,7% (n=8). Стадирование РТК осуществлялось согласно Международной классификации TNM (7 издание). Заболевание диагностировано на I, II, III и IV стадиях в 2,1% (n=3), 16,4% (n=23), 24,3% (n=34) и 57,1% (n=80) случаях, соответственно. У 31,2% больных (n=45) опухоль прорастала все слои стенки кишки с распространением в жировую клетчатку и у 54,3% (n=76) распространялась в окружающие органы и ткани или прорастала в серозную оболочку при локализации в верхнеампулярном и ректосигмоидном отделах прямой кишки. Метастазы в 1-3 регионарных

лимфоузлах выявлены у 26,4% пациентов (n=37) и более чем в 3 лимфоузлах – у 34,3% (n=48).

У больных IV стадией РТК (n=80) отдаленные метастазы чаще всего регистрировались в печени (71,3% (n=57)), по брюшине (17,5% (n=14)) и в легких (17,5% (n=14)), при возврате заболевания у пациентов с локализованным РТК (n=60) - в печени (41,7% (n=25)), в легких (21,7% (n=13)), по брюшине (11,7% (n=7)) и в яичниках у женщин (11,7% (n=7)). Локо-регионарный рецидив основного заболевания отмечен у 18 больных локализованным РТК, соответственно. У 41 (29,3%) пациента диагностировано две и более зоны отдаленного метастазирования.

Химиотерапия в моно- и/или полирежиме проведена 118 (84,3%) пациентам, из них 35 (25%) больным в комбинации с таргетной терапией (26 пациентам с добавлением бевацизумаба и 9 больным – анти-*EGFR*-моноклональных антител). Под полной циторедукцией мы понимали удаление всех макроскопически видимых очагов опухоли, включая первичное новообразование и отдаленные метастазы в пределах здоровых тканей (R0 – резекция). Неполная циторедукция характеризовалась удалением первичной опухоли с оставлением метастатических очагов либо частичным удалением/резекцией отдаленных метастазов. В группу полных циторедуктивных вмешательств включены пациенты с генерализованным колоректальным раком, перенесшие мультивисцеральные вмешательства (n=22 (56,4%)) и больные, оперированные по поводу возврата заболевания (n=17 (43,6%)). Группа больных с хирургическим лечением в объеме неполного циторедуктивного пособия характеризовалась удалением либо только первичной опухоли, либо только метастатических очагов или удалением первичного очага с частичной метастазэктомией (таблица 9).

Таблица 9 – Виды хирургического вмешательства у больных генерализованным РТК.

Полная циторедукция (N=39)	
<u>Удаление первичной опухоли и метастазэктомия</u> (больные IV ст. РТК)	<u>22</u>
- резекция печени	14
- сальпингоовариэктомия (СОЭ)	4
- резекция легкого	1
- лимфаденэктомия	3
<u>Только метастазэктомия</u> (возврат болезни)	<u>17</u>
- резекция печени	8
- удаление рецидивной опухоли	5
- СОЭ	2
- резекция легкого	1
- резекция печени+СОЭ	1
Неполная циторедукция (N=23)	
<u>больные IV ст.</u>	<u>17</u>
Удаление только первичной опухоли	7
Удаление только mts	2
Удаление первичной опухоли и частичное удаление mts	8
<u>возврат болезни</u>	
- частичная метастазэктомия	6

Развитие последующего прогрессирования отмечено у 77,9% (n=109) больных. Медиана времени наблюдения составила 11,0±0,6 месяцев (95% CI 9.882-12.118 (2-30 месяцев)).

Характеристика группы наследственного рака. Данная группа разделена на две подгруппы - пациентов с подозрением на синдром Линча и больных с

формально-генетическим диагнозом – семейный аденоматозный полипоз.

В первую подгруппу включены 117 пациентов (57 мужчин (48,7%) и 60 женщин (51,3%)). Средний возраст на момент манифестации РТК составил $41,8 \pm 1,2$ лет. У 61,5% (n=72) больных преобладало поражение левой половины ободочной кишки и прямой кишки. Частота поражения отдельных участков толстой кишки представлена на рисунке 7.



Рисунок 7 - Частота поражения отдельных участков толстой кишки в группе больных с формально-генетическим диагнозом СЛ.

Самым частым гистологическим вариантом была аденокарцинома кишечного типа (78,6% (n=92)), далее по частоте встречалась муцинозная аденокарцинома (12,8% (n=15)), перстневидноклеточный (0,9% (n=1)) и медуллярный (0,9% (n=1)) типы рака. Наличие муцинозного компонента и перстневидных клеток выявлены в 15,4% случаев (n=18); лимфоплазмозитарной инфильтрации - в 2,6% случаев (n=3). В опухолях доминировала умеренная степень дифференцировки (51,2% (n=60)). Стадирование РТК осуществлялось согласно Международной классификации TNM (7 издание). Заболевание диагностировано на I, II, III и IV стадиях в 9,5% (n=11), 31,6% (n=37), 35,0% (n=41) и 15,4% (n=18) случаях, соответственно. У 44,4% больных (n=52) опухоль прорастала все слои стенки кишки с распространением в жировую клетчатку и у 31,6% (n=37) распространялась в окружающие органы и ткани или прорастала в серозную оболочку при локализации в верхнеампулярном и ректосигмоидном отделах прямой кишки. Метастазы в 1-3 регионарных лимфоузлах выявлены у

24,8% пациентов (n=29) и более чем в 3 лимфоузлах – у 17,9% (n=21). Наличие очагов отдаленного метастазирования диагностировано в 15,4% случаев (n=18).

В первой подгруппе у 43 пациентов (36,8%) РТК диагностирован в составе ПМЗН. В среднем у каждого пациента диагностировано три ЗНО (2-7 ЗНО). Временной интервал до манифестации последующей первичной опухоли составил $3,6 \pm 1,5$ лет (0-26 лет). Самыми частыми вторыми ЗНО были синхронный или метакронный РТК (51% (n=43)) и рак тела матки (12% (n=10)). Частота вторых первичных опухолей представлена на рисунке 8.

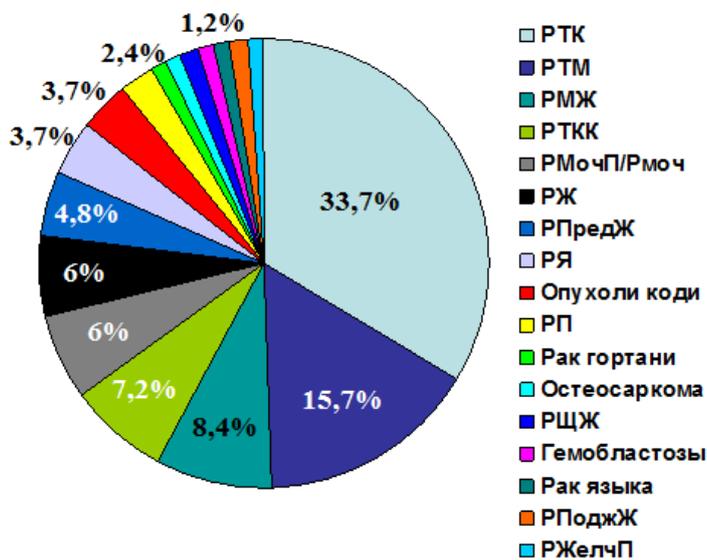


Рисунок 8 - Частота вторых первичных опухолей у больных с формально-генетическим диагнозом СЛ (РМЖ – рак молочной железы; РТКК – рак тонкой кишки; РМочП/РМоч – рак мочевого пузыря/рак мочеточника; РЖ – рак желудка; РПредЖ – рак предстательной железы; РЯ – рак яичников; РП – рак почки; РЩЖ – рак щитовидной железы; РПоджЖ – рак поджелудочной железы; РЖелчП – рак желчного пузыря).

Отягощенный онкологический семейный анамнез отмечен у 89,7% пациентов (n=105). При анализе родословных:

- число родственников с ЗНО в родословной в среднем составило 3 (1-12 родственников);

- число пораженных поколений - 2,5 (1-4 поколения);

- наличие родственников ПСР с любым ЗНО независимо от возраста выявлено у 77,1% больных (n=81), из них у 39,5% (n=32) диагностирован РТК в возрасте до 50 лет;

- наличие родственников ВСР с ЗНО выявлено у 76,2% больных (n=80);

- наличие родственников ТСР с ЗНО выявлено у 30,5% больных (n=32);

- число родственников ПСР с ЗНО в родословной в среднем составило 2 (0-6 родственников);

- число родственников ВСР с ЗНО в родословной – 2 (0-5 родственников);

- число родственников ТСР с ЗНО в родословной – 1 (0-2 родственника).

На рисунке 9 представлен спектр ЗНО в семейном анамнезе больных с формально-генетическим диагнозом СЛ.

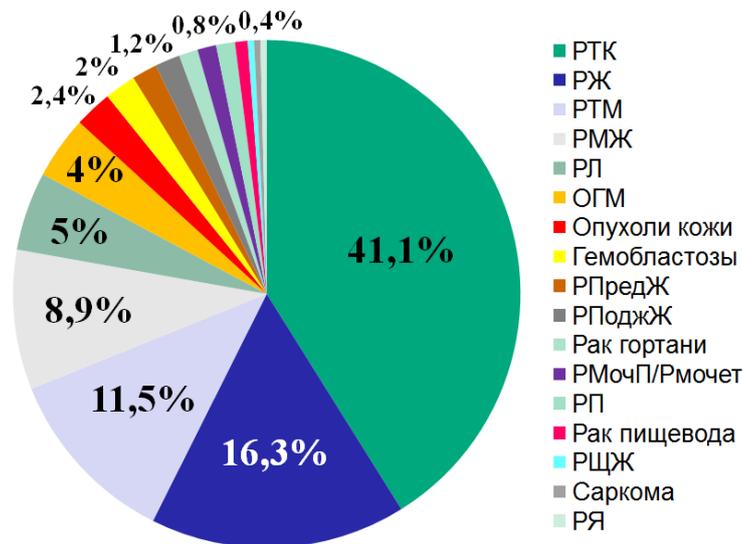


Рисунок 9 – Спектр ЗНО в семейном анамнезе больных с формально-генетическим диагнозом СЛ (РЖ – рак желудка; РМЖ – рак молочной железы; РЛ – рак легких; ОГМ – опухоль головного мозга; РПредЖ – рак предстательной железы; РПоджЖ – рак поджелудочной железы; РМочП/РМоч – рак мочевого пузыря/рак мочеточника; РП – рак почки; РЩЖ – рак щитовидной железы; РЯ – рак яичников).

Во вторую подгруппу включены 26 пациентов (16 мужчин (61,5%) и 10 женщин (38,5%). Средний возраст на момент манифестации РТК составил 42,3 года. В данной подгруппе преобладало поражение левой половины ободочной

кишки и прямой кишки (69,2% (n=18)). Частоты поражения отдельных участков толстой кишки представлены на рисунке 10.



Рисунок 10 - Частоты поражения отдельных участков толстой кишки у пациентов с подозрением на семейный аденоматозный полипоз.

Самым частым гистологическим вариантом была аденокарцинома кишечного типа (73,1% (n=19)), у двух пациентов (7,7%) диагностирована муцинозная аденокарцинома. Наличие муцинозного компонента отмечено у двух больных (7,7%). В опухолях доминировали умеренная и высокая степени дифференцировки (38,5% (n=10) и 19,2% (n=5), соответственно). У всех пациентов выявлено полипозное поражение толстой кишки. При этом умеренная степень поражения (не более 100 полипов) отмечалась у 10 больных (38,5%), у 16 пациентов диагностировано более 100 полипов (61,5%). Морфологически полипы у всех больных были представлены разрастаниями тубулярных и тубуло-ворсинчатых аденом, за исключением двух пациентов со смешанным полипозом (с наличием классических и зубчатых аденом). Стадирование РТК осуществлялось согласно Международной классификации TNM (7 издание). Заболевание диагностировано на I, II, III и IV стадиях в 15,4% (n=4), 19,2% (n=5), 26,9% (n=7) и 34,6% (n=9) случаях, соответственно. Прорастание всех слоев стенки кишки с распространением в жировую клетчатку и/или окружающие органы и ткани или серозную оболочку при локализации в верхнеампулярном и ректосигмоидном отделах прямой кишки выявлено в 69% случаев (n=18). Метастазы в 1-3 регионарных лимфоузлах выявлены у 7,7% пациентов (n=2) и

более чем в 3 лимфоузлах – у 30,8% больных (n=8). Наличие очагов отдаленного метастазирования диагностировано в 34,6% случаев (n=9).

Отягощенный онкологический семейный анамнез отмечен у 69,2% пациентов (n=18). При анализе родословных:

- наличие родственников ПСР с ЗНО выявлено у 77,8% больных (n=14) с отягощенным семейным анамнезом, из них у 50% пациентов отмечено наличие родственника ПСР с РТК в возрасте до 50 лет;

- наличие родственников ВСР с ЗНО выявлено у 77,8% больных (n=14);

- наличие родственников ТСР с ЗНО выявлено у 19,2% больных (n=5);

- число пораженных поколений в среднем составило 2,5 (1-4 поколения);

- число родственников с ЗНО в родословной – 3,3 (1-9 родственников);

- число родственников ПСР с ЗНО в родословной – 1,2 (0-2 родственников);

- число родственников ВСР с ЗНО в родословной – 2,1 (0-4 родственников);

- число родственников ТСР с ЗНО в родословной – 1,8 (0-3 родственника).

У 7 пациентов (26,9%) диагностирован синхронный или метасинхронный РТК. У одной больной вторым первичным заболеванием являлся РЩЖ. Отмечены также другие клинические проявления САП, т.к. остеома нижней челюсти – у 1 больного и фиброматоз передней грудной стенки – у 1 пациентки.

2.2. Молекулярные методы исследования

Выделение ДНК из образцов опухолевой ткани, полученных из срезов парафиновых блоков под патоморфологическим контролем, выполнено с применением зарегистрированных коммерческих комплектов реагентов Cobas DNA Sample Preparation Kit (Roche Diagnostics, Швейцария) и QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя.

С целью оценки качества выделенной ДНК, выполнялось измерение ее концентрации и отношения A260/280 на флуориметре и/или спектрофотометре. Все образцы ДНК хранятся при температуре -20⁰С в биобанке лаборатории клинической онкогенетики ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Поиск соматических мутаций в генах *KRAS* (2 и 3 экзоны), *NRAS* (2, 3 и 4 экзоны) и *BRAF* (11 и 15 экзоны) выполнялся с применением:

1) Наборов реагентов Cobas® *KRAS* Mutation Test, cobas® 4800 *BRAF* V 600 Mutation Test, *BRAF*/*NRAS* Mutation Test (LSR) (Roche Diagnostics, Швейцария) на платформе Cobas Z 480 согласно инструкциям производителя;

2) прямого секвенирования продуктов амплификации по Сэнгеру на платформах Beckman Coulter Genome Lab GeXP (Beckman Coulter, США) и ABI PRISM Genetic Analyzer 3100» (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя. Олигонуклеотидные последовательности для ПЦР-диагностики соматических мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Последовательности олигонуклеотидов для ПЦР-диагностики соматических мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF*.

<i>KRAS</i> – 2 экзон F	ttaaccttatgtgtgacatgttctaa
<i>KRAS</i> – 2 экзон R	tggatcatattcgtccaca
<i>KRAS</i> – 3 экзон F	tgtgtttctcccttcagga
<i>KRAS</i> – 3 экзон R	ttatggcaatacacaaagaaagc
<i>NRAS</i> – 3 экзон F	cacccccaggattcttacag
<i>NRAS</i> – 3 экзон R	ccccataaagattcagaacasa
<i>BRAF</i> – 15 экзон F	tcataatgcttgctctgatagga
<i>BRAF</i> – 15 экзон R	ctttctagtaactcagcagc

Режим проведения ПЦР:

1 этап: денатурация при $t=95^{\circ}\text{C}$ в течение 2 мин

2 этап: 40 циклов ПЦР

- денатурация при $t=95^{\circ}\text{C}$ в течение 30 сек

- отжиг олигонуклеотидов при $t=59^{\circ}\text{C}$ в течение 30 сек

- элонгация при $t=72^{\circ}\text{C}$ в течение 30 сек

3 этап: элонгация при $t=72^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин

4 этап: охлаждение и хранение при $t=72^{\circ}\text{C}$ - 12°C

Статус микросателлитной нестабильности оценивался с помощью стандартной панели однонуклеотидных маркеров BAT25, BAT26, NR21, NR24 и

NR27 методом фрагментного анализа на платформе Beckman Coulter Genome Lab GeXP (Beckman Coulter, США). Олигонуклеотидные последовательности представлены в таблице 11.

Таблица 11 - Последовательности олигонуклеотидов для ПЦР-диагностики микросателлитной нестабильности.

NR21 F	gag tcg ctg gca cag ttc ta
NR21 R	/cy5/- ctg gtc act cgc gtt tac aa
NR24 F	gct gaa ttt tac ctc ctg ac
NR24 R	/cy5/- att gtg cca ttg cat tcc aa
NR27 F	aac cat gct tgc aaa cca ct
NR27 R	/cy5/- cga taa tac tag caa tga cc
BAT25F	tac cag gtg gca aag ggc a
BAT25R	/cy5/- tct gca ttt taa cta tgg ctc
BAT26F	ctg cgg taa tca agt ttt tag
BAT26R	/cy5/- aac cat tca aca ttt tta acc c

Режим проведения ПЦР:

1 этап: денатурация при $t=95^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин

2 этап: 40 циклов ПЦР

- денатурация при $t=95^{\circ}\text{C}$ в течение 30 сек

- отжиг олигонуклеотидов при $t=57^{\circ}\text{C}$ в течение 30 сек

- элонгация при $t=72^{\circ}\text{C}$ в течение 15 сек

3 этап: элонгация при $t=72^{\circ}\text{C}$ в течение 2 мин

4 этап: охлаждение и хранение при $t=72^{\circ}\text{C}$ - 12°C

Экстракция ДНК из образцов цельной периферической венозной крови пациентов выполнена с применением зарегистрированных коммерческих комплектов реагентов «ДНК-сорб-В» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) и MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Diagnostics, Швейцария) согласно инструкции производителя.

Генотипирование образцов ДНК на предмет наличия герминальных мутаций в генах *MLH1*, *MSH2* и *APC* выполнялось с применением:

1) конформационно-чувствительного электрофореза (CSGE; confirmation sensitive gel electrophoresis) для электрофоретического разделения мутантных фрагментов после амплификации всех кодирующих участков генов *MLH1*, *MSH2* и *APC*;

2) анализа кривых плавления HRM (high resolution melting curve analysis) после проведения ПЦР в реальном времени и плавления продуктов амплификации всех кодирующих участков генов *MLH1*, *MSH2* и *APC* на платформе LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Швейцария);

3) прямого секвенирования продуктов амплификации по Сэнгеру на платформах Beckman Coulter Genome Lab GeXP (Beckman Coulter, США) и ABI PRISM Genetic Analyzer 3100» (Applied Biosystems, США) согласно инструкциям производителя;

4) таргетного пиросеквенирования с применением разработанной мультигенной панели на платформе 454 Sequencing GS Junior (Roche Diagnostics, Швейцария) с использованием олигонуклеотидных зондов NimbleGen Sequence Capture. Все этапы пробоподготовки, создания библиотек и секвенирования были выполнены согласно протоколам производителя.

Олигонуклеотидные последовательности представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Последовательности олигонуклеотидов для ПЦР-диагностики герминальных мутаций в генах *MLH1*, *MSH2* и *APC*.

<i>MLH1</i> 1 exon F	agg cac tga ggt gat tgg c
<i>MLH1</i> 1 exon R	tcg tag ccc tta agt gag c
<i>MLH1</i> 2 exon F	aat atg tac att aga gta gtt g
<i>MLH1</i> 2 exon R	cag aga aag gtc ctg act c
<i>MLH1</i> 3 exon F	aga gat ttg gaa aaa tga gta ac
<i>MLH1</i> 3 exon R	aca atg tca tca cag gag g
<i>MLH1</i> 4 exon F	aac ctt tcc ctt tgg tga gg
<i>MLH1</i> 4 exon R	gat tac tct gag acc tag gc
<i>MLH1</i> 5 exon F	gat ttt ctc ttt tcc cct tgg g
<i>MLH1</i> 5 exon R	caa aca aag ctt caa caa ttt ac
<i>MLH1</i> 6 exon F	ggg ttt tat ttt caa gta ctt cta tg
<i>MLH1</i> 6 exon R	gct cag caa ctg ttc aat gta tga gc

MLH1 7 exon F	cta gtg tgt gtt ttt ggc
MLH1 7 exon R	cat aac ctt atc tcc acc
MLH1 8 exon F	ctc agc cat gag aca ata aat cc
MLH1 8 exon R	ggt tcc aaa ata atg tga tgg
MLH1 9 exon F	aaa agc ttc aga atc tc
MLH1 9 exon R	ctg tgg gtg ttt cct gtg agt gg
MLH1 10 exon F	cat gac ttt gtg tga atg tac acc
MLH1 10 exon R	gag gag agc ctg ata gaa cat ctg
MLH1 11 exon F	ggg ctt ttt ctc ccc ctc cc
MLH1 11 exon R	aaa atc tgg gct ctc acg
MLH1 12 exon F	agg tct atg ccc acc aga tg
MLH1 12 exon R	att cca gca cca ttc cag ag
MLH1 13 exon F	tgc aac cca caa aat ttg gc
MLH1 13 exon R	ctt tct cca ttt cca aaa cc
MLH1 14 exon F	tgg tgt ctc tag ttc tgg
MLH1 14 exon R	cat tgt tgt agt agc tct gc
MLH1 15 exon F	ccc att ttg tcc caa ctg g
MLH1 15 exon R	cga tca gtt gaa att tca g
MLH1 16 exon F	cat ttg gat gct ccg tta aag c
MLH1 16 exon R	cac ccg gct gga aat ttt att tg
MLH1 17 exon F	gga aag cac tgg aga aat ggg
MLH1 17 exon R	ccc tcc agc aca cat gca tgt acc g
MLH1 18 exon F	taa gta gtc tgt gat ctc cg
MLH1 18 exon R	ttg tat gag gtc ctg tcc
MLH1 19 exon F	gac acc agt gta tgt tgg
MLH1 19 exon R	gag aaa gaa gaa cac atc cc
MSH2 1 exon F	tcg cgc att ttc ttc aac c
MSH2 1 exon R	gtc cct ccc cag cac gc
MSH2 2 exon F	gaa gtc cag cta ata cag tgc
MSH2 2 exon R	ctt cac att ttt att ttt cta ctc
MSH2 3 exon F	gct tat aaa att tta aag tat gtt c
MSH2 3 exon R	gcc ttt cct agg cct gga atc tcc
MSH2 4 exon F	ttc att ttt gct ttt ctt att cc
MSH2 4 exon R	ata tga cag aaa tat cct tc
MSH2 5 exon F	cca agg aaa atg agg gac ttc
MSH2 5 exon R	agt gga gga ggg gag aga aa
MSH2 6 exon F	gtt ttc act aat gag ctt gcc

Продолжение таблицы 12

<i>MSH2 6 exon R</i>	gtg gta taa tca tgt ggg
<i>MSH2 7 exon F</i>	gac tta cgt gct tag ttg
<i>MSH2 7 exon R</i>	gta tat att gta tga gtt gaa gg
<i>MSH2 8 exon F</i>	gat ttg tat tct gta aaa tga gat c
<i>MSH2 8 exon R</i>	ggc ctt tgc ttt tta aaa ata ac
<i>MSH2 9 exon F</i>	gtc ttt acc cat tat tta tag g
<i>MSH2 9 exon R</i>	gta tag aca aaa gaa tta ttc c
<i>MSH2 10 exon F</i>	ggg agt agg tat tta tgg aat ac
<i>MSH2 10 exon R</i>	cat gtt aga gca ttt agg g
<i>MSH2 11 exon F</i>	cac att gct tct agt aca c
<i>MSH2 11 exon R</i>	cca ggt gac att cag aac
<i>MSH2 12 exon F</i>	att cag tat tcc tgt gta c
<i>MSH2 12 exon R</i>	cgt tac ccc cac aaa gc
<i>MSH2 13 exon F</i>	cgc gat taa tca tca gtg
<i>MSH2 13 exon R</i>	gga cag aga cat aca ttt cta tc
<i>MSH2 14 exon F</i>	tac cac att tta tgt gat gg
<i>MSH2 14 exon R</i>	agg gta gta agt ttc cc
<i>MSH2 15 exon F</i>	ctc ttc tca tgc tgt ccc
<i>MSH2 15 exon R</i>	ata gag aag cta agt taa ac
<i>MSH2 16 exon F</i>	taa tta cta atg gga cat tc
<i>MSH2 16 exon R</i>	tac ctt cat tcc att act gg
<i>APC 1 exon F</i>	agtccaagggtagccaagga
<i>APC 1 exon R</i>	tcttacctcaagtttacaagagggaat
<i>APC 2 exon F</i>	tgcgtgctttgagagtgatct
<i>APC 2 exon R</i>	accaacacccaaatcgagag
<i>APC 3 exon F</i>	tgtttcagtcattatattgtggt
<i>APC 3 exon R</i>	actggagtacacaaggcaatgt
<i>APC 4 exon F</i>	agtattgctcttctgcagtctt
<i>APC 4 exon R</i>	agtttcaataagttgtactgcca
<i>APC 5 exon F</i>	gcaccatgactgacgtatttgc
<i>APC 5 exon R</i>	gctcttcgctgttttactt
<i>APC 6 exon F</i>	cctgagcttttaagtggtagcc
<i>APC 6 exon R</i>	accacaaacaagaaaggca
<i>APC 7 exon F</i>	agcctacaccatttttgcattgt
<i>APC 7 exon R</i>	accatcttgcttcatacttttctga
<i>APC 8 exon F</i>	acagacacttcatttggagtacct
<i>APC 8 exon R</i>	ttacaggtgtgagccactgc

APC 9.1 exon F	ttggcttttgatattaagtcgt
APC 9.1 exon R	tgatgttgaggagtgctgca
APC 9.2 exon F	cggggcagtaaagaggctc
APC 9.2 exon R	gctttgaaacatgcactacgatgt
APC 10 exon F	agggttatattagtgatccctgca
APC 10 exon R	tccaccagtaattgtctatgtcat
APC 11 exon F	tgtcttttctcttgcctt
APC 11 exon R	tcattgtttaatgaggagagtgaaaa
APC 12 exon F	aagcttggttcaagttgtct
APC 12 exon R	cagaggttgcagtgagctga
APC 13 exon F	accacggctagccagaattt
APC 13 exon R	atggctaaaagaaggcagca
APC 14 exon F	tgagggacgggcaataggat
APC 14 exon R	tgcttacaattagggtcttttgagagt
APC 15A exon F	actgcatacacattgtgacct
APC 15A exon R	tgcagcacttcccatagcaa
APC 15B exon F	ctaaagaccaggaagcattatg
APC 15B exon R	aagtcccaaggcatctcat
APC 15C exon F	attagatgctcagcacttatcaga
APC 15C exon R	gtgttaccagctccttctcat
APC 15D exon F	tggcaacatgactgtccttca
APC 15D exon R	gtcatggaagaagtgtcagcca
APC 15E exon F	ttcaaagcgaggtttgcagatc
APC 15E exon R	gctctgctgccatacacattc
APC 15F exon F	cagatgagagaaatgcacttagaa
APC 15F exon R	gtcaaatgaaaccctcgattg
APC 15G exon F	tgccttaatgccaattagaata
APC 15G exon R	tatggtcaataccagccg
APC 15H exon F	gtcaaatgaaaccctcgattga
APC 15H exon R	cagttgaactctggaaggcaa
APC 15I exon F	cctagcccataaaatacatagtgc
APC 15I exon R	gacaatcaaggaatcaaagtacaa
APC 15J exon F	atgggcaagacccaacacata
APC 15J exon R	ggttcagaaacaaatcgagtggg
APC 15K exon F	tgtttctccatacaggtcacg
APC 15K exon R	tcatgtggatcagcctattga
APC 15L exon F	ccaattatagtgaacgttactctg

APC 15L exon R	gaatacgtccacattcatc
APC 15M exon F	caaagcagtaaaaccgaacat
APC 15M exon R	tgtaatcagacgacacaggaag
APC 15N exon F	catctttgtcatcagctgaaga
APC 15N exon R	aatctccctccaaaagtgggt
APC 15O exon F	cgaagtccagcagtgctcac
APC 15O exon R	gagagtcgttcgattgcca
APC 15P exon F	gttcaggagaccccactcat
APC 15P exon R	aagcacctactgctgaaaagag
APC 15Q exon F	aaccaagcgagaagtaccta
APC 15Q exon R	acaatgggaatgaaacagaat
APC 15R exon F	cttggtcatccagcctgagt
APC 15R exon R	tgccaacaaagtcatcacg
APC 15S exon F	gcagcctaaagaatcaaatga
APC 15S exon R	atcacaaaacaggttgcaacc
APC 15T exon F	tgtggcaaggaaaccaagtc
APC 15T exon R	gataccattccacagaaggcag
APC 15U exon F	ggaggagcacagtcaggtga
APC 15U exon R	caagcatctgcgtcgtcttc
APC 15V exon F	acaagcctttccgtgtga
APC 15V exon R	agagttttctcagacaacaaga
APC 15W exon F	aaaagaaaccaacttcaccagt
APC 15W exon R	cattacacgcctattgaagga

Режим проведения ПЦР:

1 этап: денатурация при $t=95^{\circ}\text{C}$ в течение 2 мин

2 этап: 40 циклов ПЦР

- денатурация при $t=95^{\circ}\text{C}$ в течение 30 сек

- отжиг олигонуклеотидов при $t=59^{\circ}\text{C}$ в течение 30 сек

- элонгация при $t=72^{\circ}\text{C}$ в течение 30 сек

3 этап: элонгация при $t=72^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин

4 этап: охлаждение и хранение при $t=72^{\circ}\text{C} - 12^{\circ}\text{C}$

Режим проведения HRM-ПЦР:

1 этап: денатурация при $t=95^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин

2 этап: 45 циклов ПЦР

- денатурация при $t=95^{\circ}\text{C}$ в течение 30 сек
- отжиг олигонуклеотидов при $t=59^{\circ}\text{C}$ в течение 30 сек
- элонгация при $t=72^{\circ}\text{C}$ в течение 15 сек

3 этап: элонгация при $t=72^{\circ}\text{C}$ в течение 2 мин

4 этап: плавление продуктов ПЦР при $t=72^{\circ}\text{C} - 95^{\circ}\text{C}$

5 этап: охлаждение и хранение при $t=95^{\circ}\text{C} - 12^{\circ}\text{C}$

Детекция флуоресцентного сигнала осуществлялась как во время отжига олигонуклеотидов на каждом цикле ПЦР, так и при плавлении продуктов ПЦР с частотой 45 на 1°C .

2.3. Статистическая обработка результатов исследования

Статистическая обработка результатов исследования производилась с применением программы математической обработки данных IBM SPSS Statistics (версия 22.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA), а также компьютерной программы электронных таблиц Microsoft Excel.

Выбор центральных характеристик исследуемых данных осуществляли после изучения формы их распределения. Рассчитывали абсолютные и относительные частоты, среднее значение и его 95% доверительные границы, а также ошибку среднего.

Достоверность различий частот изучаемых признаков оценивалась с помощью критерия χ^2 Пирсона при анализе таблиц сопряженности, а также критерия Стьюдента. Для малых выборок рассчитывали χ^2 с поправкой Йейтса и точный критерий Фишера. Рассчитывали точное значение p (различия считали достоверными при $p \leq 0.05$).

Выживаемость без прогрессирования рассчитывали, как время от включения пациента в исследование (начало специфического лечения) до прогрессирования болезни, смерти от любой причины или даты последнего наблюдения пациента. Опухоль-специфическая выживаемость определялась временем от включения пациента в исследование (начало специфического лечения) до смерти от основного заболевания или даты последнего наблюдения

пациента; общая выживаемость - временным интервалом от момента включения пациента в исследования до смерти от любой причины или даты последнего наблюдения пациента.

Выживаемость без прогрессирования, опухоль-специфичную и общую выживаемости оценивали с помощью метода Каплан-Майера, различия выживаемости анализировали с применением теста log-rank.

Одно- и многофакторный анализ взаимосвязи между зависимой и независимыми переменными (определение независимого влияния потенциальных факторов риска на скорость наступления изучаемого события за изучаемый промежуток времени) осуществляли с применением модели пропорциональных рисков (регрессии) Кокса.

Чувствительность диагностических критериев определяли, как долю истинно-положительных диагнозов среди больных, соответствующих критериям. Специфичность определяли, как долю истинно-отрицательных диагнозов среди больных, не соответствующих критериям. Точность определялась соотношением числа истинно-положительных и истинно-отрицательных диагнозов к общему числу окончательных диагнозов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Изучение клинико-генетических характеристик спорадического рака толстой кишки

3.1.1. ДНК-генотипирование соматических мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* в образцах опухолевой ткани больных генерализованным раком толстой кишки

Поиск соматических мутаций в генах *KRAS* (2 и 3 экзоны), *NRAS* (2, 3 и 4 экзоны) и *BRAF* (11 и 15 экзоны) выполнен в образцах ДНК, выделенных из опухолевой ткани, полученной из срезов парафиновых блоков под патоморфологическим контролем. Средняя концентрация ДНК, валидная для выполнения исследования, составила 10 нг/мкл. ДНК-генотипирование проведено всем пациентам РТК спорадической группы (n=140).

В результате исследования соматические мутации во 2 и 3 экзонах гена *KRAS* выявлены у 65 из 140 (46,4%) пациентов, во 2, 3 и 4 экзонах гена *NRAS* – у 12 из 140 (8,6%) больных и в 11 и 15 экзонах гена *BRAF* у 16 из 140 (11,4%) пациентов. В нашем исследовании соматические мутации в генах *RAS* и *BRAF* были взаимоисключающими. Не выявлено ни одного случая сочетания мутаций *KRAS* и *NRAS* также. В таблице 13 и на рисунке 11 представлены результаты *RAS/BRAF*-генотипирования на платформе Cobas Z. Все выявленные варианты строения генов *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* подтверждены методом капиллярного секвенирования по Сэнгеру (рисунок 12).

Таблица 13 - Результаты *RAS/BRAF*-генотипирования в образцах опухолевой ткани больных спорадической группы.

<i>mutKRAS</i> 2 и 3 экзоны	<i>mutNRAS</i> 2, 3 и 4 экзоны	<i>mutBRAF</i> 11 и 15 экзоны
46,4% (65/140)	8,6% (12/140)	11,4% (16/140)

Position	Sample ID	Kit	Control Type	Result	Flags	Accepted by
A01:A02	7A1Y175185I001W	1	Mutant Control	Valid		
B01:B02	7A1Y175185I001W	1	Negative Control	Valid		
C01:C02	7A1Y175185I001W	1	Calibrator	Valid		

Position	Sample ID	Kit	Result 1	Result 2	Flags	Accepted by
D01:D02	rk397	1	No Mutation Detected	N/A		
E01:E02	rk398	1	Mutation Detected	Codon 12/13		
F01:F02	rk399	1	Mutation Detected	Codon 12/13		
G01:G02	RGmts47	1	No Mutation Detected	N/A		
H01:H02	RG47	1	No Mutation Detected	N/A		

Position	Sample Name	Test Result	Mutation Result	Ct (Channel: MMx1;MMx2;MMx3)	Flag
C01.C02.C03	RK 566	Mutation Detected	NRAS Q61X	Ch 1: NaN; NaN; NaN	
				Ch 2: NaN; 29.7; NaN	
				Ch 3: NaN; NaN; 40.2	
				Ch 4: 30.7; 29.9; 29.3	
F01.F02.F03	RK 549	Mutation Detected	BRAF V600E/E2/D	Ch 1: 28.8; 39.4; 38.8	
				Ch 2: NaN; 39.8; 42.1	
				Ch 3: NaN; NaN; 40.0	
				Ch 4: 28.8; 27.6; 27.8	

Рисунок 11 - Результаты *RAS/BRAF*-генотипирования на платформе Cobas Z.

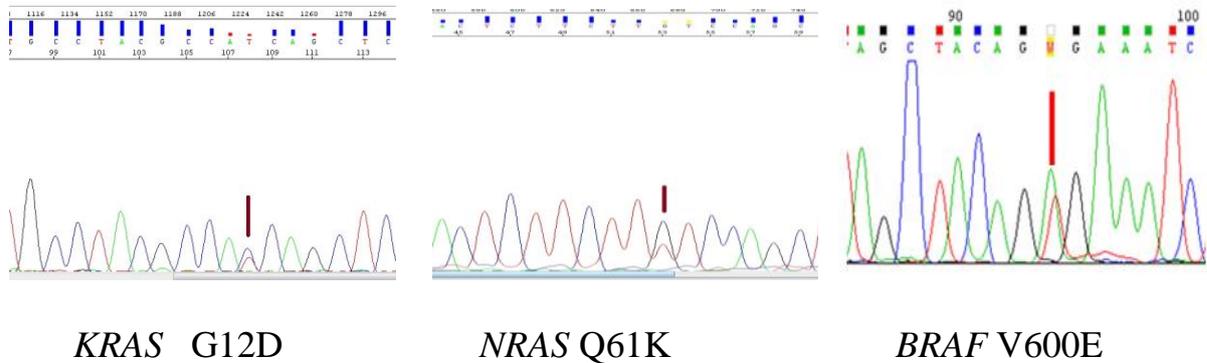


Рисунок 12 - Фрагменты сиквенса 2 экзона гена *KRAS*, 3 экзона гена *NRAS* и 15 экзона гена *BRAF*.

Сравнительная клиничко-морфологическая характеристика больных РТК в зависимости от статуса генов *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* в образцах опухолевой ткани

Для сравнительного анализа клиничко-морфологических данных все больные стратифицированы в зависимости от мутационного статуса генов *KRAS*, *NRAS* и *BRAF*, сформирована контрольная группа пациентов с отсутствием соматических

мутаций в каждом из перечисленных генов (больных с т.н. «диким» типом генов *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* (*wtKRAS*, *wtNRAS* и *wtBRAF*)). Учитывались возраст на момент манифестации РТК, распределение по полу, локализация первичного поражения, гистологический вариант опухоли, наличие лимфоплазмочитарной инфильтрации, муцинозного компонента и перстневидных клеток, степень дифференцировки опухоли, стадия заболевания. Данные сравнительного анализа клинико-морфологических характеристик пациентов в зависимости от результатов генотипирования приведены в таблице 14.

Таблица 14 - Клинико-морфологические данные пациентов спорадической группы в зависимости от результатов RAS/BRAF-генотипирования

Признак		<i>mutKRAS</i> N=65		<i>mutNRAS</i> N=12		<i>mutBRAF</i> N=16		<i>wtKRAS_wtNRAS_wtBRAF</i> N=47	
		Частота	Процент	Частота	Процент	Частота	Процент	Частота	Процент
Возраст на момент манифестации РТК, лет		55,2±1,7	-	54,9±4,2	-	54,8±3,5	-	55,1±2,0	-
Пол	мужской	30	46,2±6,2	6	50,0±15,0	5	31,3±12,0	28	59,6±7,2
	женский	35	53,8±6,2	6	50,0±15,0	11	68,7±12,0	19	40,4±7,2
Локализация	пр ¹	13	20,0±5,0	1	8,3±8,3	11	68,7±12,0* p<0.001	9	19,1±4,2
	лев ²	52	80,0±5,0	11	91,7±8,3	5	31,3±12,0* p<0.001	38	80,9±4,2
Гистологический вариант	АК ³	56	86,1±4,3	10	83,4±11,2	10	62,4±12,5	41	87,3±5,2
	МАК ⁴	4	6,2±2,3	1	8,3±8,3	3	18,8±10,1	4	8,5±4,1
	НЭР ⁵	1	1,5±1,5	1	8,3±8,3	1	6,3±6,3	-	-
	ПКР ⁶	-	-	-	-	-	-	1	2,1±2,1
	н/д ⁷	4	6,2±2,3	-	-	2	12,5±8,5	1	2,1±2,1
Муцинозный компонент/ перстневидные клетки		9	13,8±4,3	2	16,6±11,2	1	6,3±6,3	6	12,8±4,9
Лимфоплазмочитарная инфильтрация		2	3,1±2,1	-	-	-	-	1	2,1±2,1
Степень дифференцировки	G1 ⁸	4	6,2±2,3	-	-	1	6,3±6,3	2	4,3±3,0
	G2 ⁹	42	64,6±5,9	9	75,0±13,1	5	31,3±12,0* p=0.049	30	63,8±7,0
	G3 ¹⁰	10	15,4±4,5	2	16,6±11,2	6	37,4±12,5	9	19,1±4,2
	н/д	9	13,8±4,3	1	8,3±8,3	4	25,0±11,2	6	12,8±4,9
Стадия	I	2	3,1±2,1	-	-	1	6,3±6,3	-	-
	II	11	16,9±4,7	-	-	2	12,5±8,5	10	21,3±6,0
	III	14	21,5±5,1	3	25,0±13,1	2	12,5±8,5	15	31,9±6,8
	IV	38	58,5±6,1	9	75,0±13,1	11	68,7±12,0	22	46,8±7,3

T	1	1	1,5±1,5	-	-	-	-	-	-
	2	5	7,7±3,3	-	-	1	6,3±6,3	-	-
	3	16	24,6±5,3	6	50,0±15,0	6	37,4±12,5	17	36,2±7,0
	4	34	52,4±6,2	5	41,7±14,7	8	50,0±12,9	29	61,7±7,1
	н/д	9	13,8±4,3	1	8,3±8,3	1	6,3±6,3	1	2,1±2,1
N	0	16	24,6±5,3	1	8,3±8,3	4	25,0 ±11,2	12	25,5±6,4
	1	22	33,9±5,8	3	25,0±13,1	3	18,8±10,1	10	21,3±6,0
	2	14	21,5±5,1* p=0.005	6	50,0±15,0	7	43,7±12,8	22	46,8±7,3
	н/д	13	20,0±5,0	2	16,7±11,2	2	12,5±8,5	3	6,4±3,6
M	0	27	41,5±6,1	3	25,0±13,1	5	31,3±12,0	25	53,2±7,3
	1	38	58,5 ±6,1	9	75,0±13,1	11	68,7±12,0	22	46,8±7,3

Примечания

1 – правая половина ободочной кишки;

2 – левая половина ободочной кишки и прямая кишка;

3 – аденокарцинома кишечного типа;

4 – муцинозная аденокарцинома;

5 – нейроэндокринный рак;

6 – перстневидноклеточный рак;

7 – нет данных;

8 – опухоль высокой степени дифференцировки;

9 - опухоль умеренной степени дифференцировки;

10 - опухоль низкой степени дифференцировки;

* - достоверно значимые различия признаков в сравнении с контрольной группой.

Характеристика генерализованного РТК с диким типом *RAS/BRAF*.

Пациенты с отсутствием соматических мутаций по всем трем исследованным генам характеризовались:

- средним возрастом манифестации РТК – 55,1 лет с более частым диагностированием у мужчин;
- доминированием левостороннего поражения;
- превалированием умереннодифференцированной аденокарциномы кишечного типа при гистологическом исследовании;
- вовлечением в патологический процесс более 3 регионарных лимфоузлов в 46,8% случаев;
- 21,3%, 31,9% и 46,8%-частотой постановки диагноза на II, III и IV стадиях заболевания, соответственно.

Характеристика *KRAS*-ассоциированного генерализованного РТК.

При сравнительном анализе клинико-морфологических характеристик больных РТК с соматическими мутациями в гене *KRAS* и пациентов с РТК с *wtKRAS*, *wtNRAS* и *wtBRAF*-генотипом выявлены следующие различия в изучаемых группах:

1) В группе больных с соматическими мутациями в гене *KRAS* РТК чаще диагностирован у женщин (53,8% vs 40,04%, $p=0.161$);

2) В контрольной группе больных отмечено статистически значимое увеличение числа больных с вовлечением в патологический процесс более 3 регионарных лимфоузлов (46,8% vs 21,5%, $p=0.005$) и прорастанием опухолью всех слоев стенки кишки с распространением в жировую клетчатку, распространением в окружающие органы и ткани или прорастанием в серозную оболочку при локализации в верхнеампулярном и ректосигмоидном отделах прямой кишки (97,9% vs 77,0%, $p=0.005$). Ограничением достоверности при сравнении указанных признаков является отсутствие исходных данных по показателям Т и N в группе *KRAS*-ассоциированного РТК в 13,8% и 20,0% случаев, соответственно.

3) Патологический *KRAS*-фенотип обуславливал более частое диагностирование заболевания на IV стадии (58,5% vs 46,8%, $p=0.223$).

Характеристика *NRAS*-ассоциированного генерализованного РТК. При сравнительном анализе клинико-морфологических характеристик пациентов с соматическими мутациями в гене *NRAS* и больных с *wtKRAS*, *wtNRAS* и *wtBRAF*-генотипом выявлены следующие различия в изучаемых группах:

1) Пациенты с патологическим *NRAS*-генотипом опухоли характеризовались более низкой частотой III стадии (25,0% vs 31,9%, $p=0.910$) и преобладанием IV стадии заболевания на момент постановки диагноза (75,0% vs 46,8%, $p=0.156$).

Характеристика *BRAF*-ассоциированного генерализованного РТК. При сравнительном анализе клинико-морфологических характеристик пациентов с соматическими мутациями в гене *BRAF* и *wtKRAS*, *wtNRAS* и *wtBRAF*-генотипом выявлены следующие различия в изучаемых группах:

1) Патологический *BRAF*-генотип опухоли чаще диагностирован у женщин (68,7% vs 40,4%, $p=0.095$);

2) РТК у пациентов с соматическими *mutBRAF* достоверно чаще локализовался в правой половине толстой кишки (68,7% vs 19,1%, $p<0.001$);

3) В контрольной группе пациентов РТК морфологически характеризовался статистически значимым преобладанием опухолей средней степени дифференцировки (63.8% vs 31.3%, $p=0.049$) по сравнению с *BRAF*-ассоциированным РТК, где доминировали образцы высокой степени злокачественности – G3 (37,4% vs 19,1%, $p=0.251$);

4) У больных *BRAF*-позитивным РТК отмечена более высокая частота опухолей муцинозной дифференцировки (18,8% vs 8,5%, $p=0.506$);

5) Пациенты с патологическим опухолевым *BRAF*-генотипом характеризовались статистически незначимым преобладанием IV стадии заболевания на момент постановки диагноза (68.7% vs 46,8%, $p=0.220$).

KRAS, *NRAS* и *BRAF*-ассоциированный профиль генерализованного РТК.

На основании данных, полученных в нашем исследовании, при сравнении с контрольной группой *KRAS*-ассоциированный РТК характеризовался более частой манифестацией у женщин, тенденцией к левостороннему поражению толстой кишки, морфологически преобладанием умереннодифференцированной аденокарциномы, более частой постановкой диагноза на IV стадии.

NRAS-ассоциированный РТК с сопоставимой частотой диагностировался у мужчин и женщин, характеризовался левосторонним поражением толстой кишки, морфологически преобладанием умереннодифференцированной аденокарциномы и диагностированием заболевания только на III и IV стадиях заболевания.

BRAF-ассоциированный РТК характеризовался более частой манифестацией у женщин, достоверным преобладанием правостороннего поражения толстой кишки, высокой частотой опухолей низкой степени дифференцировки с муцинозным компонентом, превалированием IV стадии на момент постановки диагноза.

В таблице 15 представлены обобщенные клиничко-морфологические данные больных генерализованным РТК в зависимости от *RAS/BRAF*-генотипа.

Таблица 15 - Обобщенные клинико-морфологические данные больных генерализованным РТК в зависимости от *RAS/BRAF*-генотипа опухоли.

Признак	<i>mutKRAS</i>	<i>mutNRAS</i>	<i>mutBRAF</i>	<i>wtKRAS_wtNRAS_wtBRAF</i>
Возраст, лет	55,2	54,9	54,8	55,1
Пол	жен ¹ >муж ²	жен=муж	жен>>муж	жен<муж
Локализация	лев ³ >>пр ⁴	лев>>пр	лев<<пр*	лев>>пр
Гистология	АК ⁵ 86,1%	АК 83,4%	АК 62,4%	АК 87,3%
Степень дифференцировки	G2 ⁶ 64,6%	G2 75,0%	G2 31,3%* G3 ⁷ 37,4%	G2 63,8%
IV стадия	58,5%	75,0%	68,7%	46,8%

Примечания

1 – женский пол;

2 – мужской пол;

3 - правая половина ободочной кишки;

4 – левая половина ободочной кишки и прямая кишка;

5 – аденокарцинома кишечного типа;

6 - опухоль умеренной степени дифференцировки;

7 - опухоль низкой степени дифференцировки;

* - достоверно значимые различия признаков в сравнении с контрольной группой (p<0.05).

При сравнительном анализе между группами больных в зависимости от опухолевого *RAS/BRAF*-генотипа пациенты с соматическими *BRAF*-мутациями достоверно отличались от больных с *RAS*-мутантным статусом опухоли преобладанием правостороннего поражения толстой кишки ($p < 0.001$ и $p = 0.005$ для *mutKRAS* и *mutNRAS*, соответственно) и низкой частотой опухолей средней степени дифференцировки ($p = 0.033$ и $p = 0.022$) за счет более высокого частотного показателя образцов с G3 у больных с *mutBRAF* ($p = 0.102$ и $p = 0.308$). Для других клинических и морфологических показателей статистическая разница не достигнута.

3.1.2. Оценка статуса микросателлитной нестабильности в образцах опухолевой ткани больных генерализованным РТК

Статус микросателлитной нестабильности оценен в 128 образцах опухолевой ткани пациентов с генерализованным РТК с применением стандартной панели однонуклеотидных маркеров BAT25, BAT26, NR21, NR24 и NR27, обладающих наиболее высокими показателями чувствительности, в т.ч. по сравнению с динуклеотидными маркерами [12, 184]. Результаты MSI-тестирования для 12 больных из группы спорадического РТК не представлены в связи с невозможностью однозначной интерпретации данных исследования вследствие низкого качества образцов ДНК.

Стабильный опухолевый фенотип определялся отсутствием нестабильности по всем выбранным маркерам и обозначался как MSS (Microsatellite Stable). Наличие одного нестабильного маркера позволяло относить опухоль в группу ЗНО РТК с низкой степенью микросателлитной нестабильностью – MSI-Low (MSI-L). Детектирование более одного нестабильного маркера характеризовало опухоль с высокой степенью нестабильности – MSI-High (MSI-High). Для определения характера исследуемых маркеров выполнялось парное сравнение длин соответствующих фрагментов ДНК опухолевой ткани с их нормальным значением в образцах геномной ДНК, полученной из лимфоцитов периферической венозной крови пациентов, и/или образцов нормальной ткани больных.

При анализе результатов стабильный показатель MSI (MSS) выявлен у 108

(77,1%) больных, MSI-Low – у 5 (3,6%) пациентов и MSI-High у 15 (10,7%) больных. На рисунке 13 представлены электрофореграммы маркеров NR27, NR21, NR24, BAT 25 и BAT 26 в образце опухоли со стабильным уровнем микросателлитной нестабильности (MSS) (А) и в опухоли с высоким уровнем микросателлитной нестабильности по всем исследуемым маркерам (MSI-High) (Б).

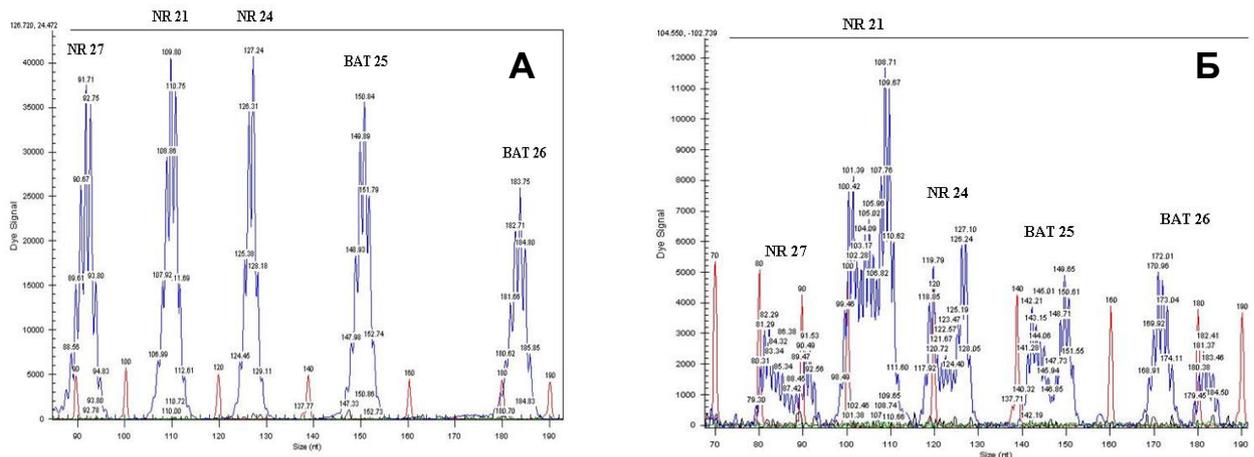


Рисунок 13 - Электрофореграммы маркеров NR27, NR21, NR24, BAT 25 и BAT 26 в образце опухоли со стабильным уровнем микросателлитной нестабильности (MSS) (А) и в опухоли с высоким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI-High) (Б).

Клинико-морфологические данные больных с различным статусом микросателлитной нестабильности в образцах опухолевой ткани

Для сравнительного анализа клинико-морфологических данных пациентов с различным статусом MSI в опухоли больные со стабильным опухолевым фенотипом объединены с пациентами, у которых в образцах РТК выявлена нестабильность по одному из исследованных маркеров, т.е. с группой MSI-Low-РТК. Клинико-морфологическая характеристика больных в зависимости от статуса MSI в опухоли, а также сравнительный анализ различий в изучаемых группах представлен в таблице 16.

Таблица 16 - Клинико-морфологические данные больных спорадической группы в зависимости от MSI-статуса опухоли.

Признак		MSS/MSI-Low N=113		MSI-High N=15	
		Частота	Процент	Частота	Процент
Возраст на момент манифестации РТК, л.		55,2±1,3	-	54,7±0,7	-
Пол	мужской	55	48,7±4,7	6	40,0±13,0
	женский	58	51,3±4,7	9	60,0±13,0
Локализация	пр. ¹	23	20,4±3,8	7	46,7±13,3
	лев. ²	90	79,6±3,8	8	53,3±13,3
Гистологический вариант	АК ³	95	84,1±3,4	10	66,6±12,0* p=0.024
	МАК ⁴	9	7,9±2,5	3	20,0±10,7
	НЭР ⁵	2	1,8±1,2	1	6,6±6,6
	ПКР ⁶	1	0,9±0,9	-	-
	н/д ⁷	6	5,3±2,1	1	6,6±6,6
Муцинозный компонент/ перстневидные клетки		15	13,3±3,2	2	13,3±9,1
Лимфоплазмоцитарная инфильтрация		3	2,7±1,5	-	-
Степень дифференцировки	G1 ⁸	8	7,1±2,4	-	-
	G2 ⁹	69	66,1±4,3	4	26,7±11,8* p=0.025
	G3 ¹⁰	18	15,9±3,4	9	60,0±13,0* p<0.001
	н/д	18	15,9±3,4	2	13,3±9,1
Стадия	I	3	2,7±1,5	-	-
	II	17	15,1±3,3	3	20,0±10,7
	III	24	30,1±2,8	4	26,7±11,8
	IV	69	66,1±4,3	8	53,3±13,3
T	1	1	0,9±0,9	-	-
	2	5	4,5±1,9	-	-
	3	39	34,5±4,5	4	26,7±11,8
	4	57	50,4±4,7	9	60,0±13,0
	н/д	11	9,7±2,8	2	13,3±9,1
N	0	26	23,0±4,0	4	26,7±11,8
	1	30	26,5±4,1	5	33,3±12,3
	2	39	34,5±4,5	4	26,7±11,8
	н/д	18	15,9±3,4	2	13,3±9,1
M	0	44	33,9±4,3	7	46,7±13,3
	1	69	66,1±4,3	8	53,3±13,3

Примечания: 1 – правая половина ободочной кишки; 2 – левая половина ободочной кишки и прямая кишка; 3 – аденокарцинома кишечного типа; 4 – муцинозная аденокарцинома; 5 – нейроэндокринный рак; 6 – перстневидноклеточный рак; 7 – нет данных; 8 – опухоль высокой степени дифференцировки; 9 – опухоль умеренной степени дифференцировки; 10 – опухоль низкой степени дифференцировки; * – достоверно значимые различия признаков (p<0.05).

При сравнительном анализе клинико-морфологических данных пациентов с различным статусом MSI в опухоли выявлены следующие различия в изучаемых группах:

- больные с высоким уровнем микросателлитной нестабильности характеризовались более высокой частотой поражения правой половины толстой кишки ($p=0.053$);

- морфологически MSI-High-статус опухоли ассоциировался с более высокой частотой встречаемости муцинозной аденокарциномы (20,0% vs 7,9%, $p=0.303$);

- достоверное значимое увеличение числа опухолей низкой степени дифференцировки (60,0% vs 15,9%, $p<0.001$) отмечено в образцах с высоким уровнем микросателлитной нестабильности. РТК со стабильным уровнем MSI и MSI-L-опухоли характеризовались доминированием умеренного показателя (66,1% vs 26,7%, $p=0.025$);

- в группе больных MSS-РТК IV стадия заболевания диагностировалась чаще по сравнению с больными РТК с дефицитом в системе репарации (66,1% vs 53,3%, $p=0.769$).

В целом, генерализованный РТК со стабильной системой репарации неправильно спаренных оснований диагностировался с сопоставимой частотой у мужчин и женщин, характеризовался доминированием левостороннего поражения, гистологически был представлен в подавляющем большинстве случаев умереннодифференцированной аденокарциномой с высокой частотой постановки диагноза на IV стадии.

MSI-High-ассоциированный генерализованный РТК характеризовался большей частотой встречаемости среди женщин, высоким процентом поражения правых отделов толстой кишки, гистологически более вариабельной картиной со статистически значимым доминированием опухолей низкой степени дифференцировки. В таблице 17 представлены обобщённые клинико-морфологические данные больных спорадической группы в зависимости от MSI-статуса.

Таблица 17 - Обобщённые клинико-морфологические данные больных спорадической группы в зависимости от MSI-статуса опухоли.

Признак	MSS/MSI-Low	MSI-High
Возраст	56,0 лет	57,0 лет
Пол	жен ¹ =муж ²	жен>муж
Локализация	лев ³ >пр ⁴	лев=пр
Гистология	АК ⁵ 84,1%	АК 66,6%*
Степень дифференцировки	G2 ⁶ 66,2%	G2 26,7%* G3⁷ 60,0%*
IV стадии	66,1%	53,3%

Примечания: 1 – женский пол; 2 – мужской пол; 3 - левая половина ободочной кишки и прямая кишка; 4 – правая половина ободочной кишки; 5 – аденокарцинома кишечного типа; 6 - опухоль умеренной степени дифференцировки; 7 - опухоль низкой степени дифференцировки; * - статистически значимые различия признаков ($p \leq 0.05$).

Частота соматических мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* в образцах РТК с различным статусом микросателлитной нестабильности

При оценке частоты соматических мутаций в генах *RAS/BRAF* отмечен высокий показатель генетических событий в обеих группах: 69% и 66,6% для MSS/MSI-Low-РТК и MSI-High-РТК, соответственно. Пациенты со стабильным опухолевым MMR-генотипом характеризовались большей частотой мутаций в генах *RAS*, в то время как у больных с высоким уровнем микросателлитной нестабильности в опухоли отмечен высокий процент *BRAF*-мутантного генотипа. Выявленные различия статистической значимости не достигли. На рисунке 14 представлены диаграммы с относительным распределением частоты соматических мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* у пациентов с различным статусом микросателлитной нестабильности в опухоли, а также диаграммы с обратным отношением.

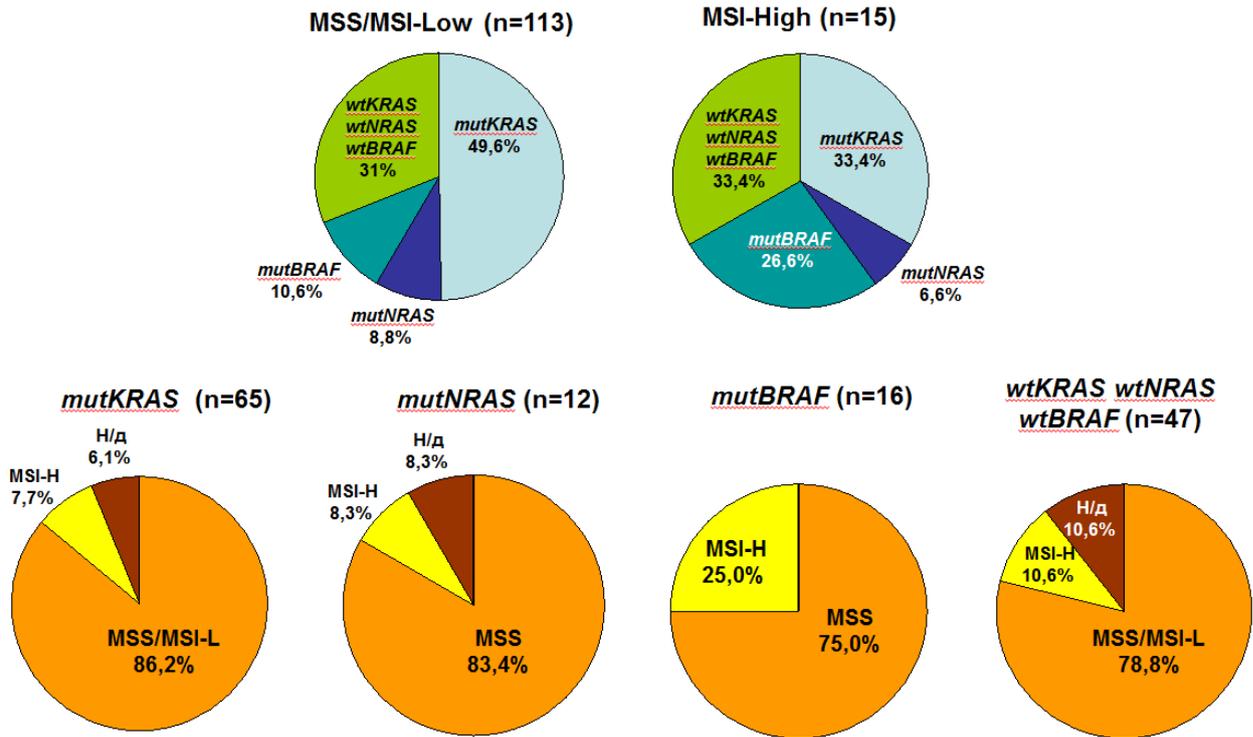


Рисунок 14 - Диаграммы с относительным распределением частоты соматических мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* у пациентов с различным статусом микросателлитной нестабильности и диаграммы с обратным отношением (распределение частоты MSS/MSI-Low и MSI-High в образцах опухолевой ткани пациентов с мРТК относительно статуса генов *RAS/BRAF*). Н/д – нет данных.

Частота соматических мутаций в генах *RAS/BRAF* и статус микросателлитной нестабильности у больных генерализованным раком ободочной и прямой кишки

В наше исследование включены 34 и 63 больных с поражением правых и левых отделов ободочной кишки, соответственно, а также 43 пациента с локализацией опухоли в прямой кишке. При оценке соматического *RAS/BRAF*-профиля наблюдалась обратная частотная зависимость: опухоли с соматическими *RAS*-мутациями локализовались преимущественно в левых отделах толстой кишки, достигая наибольшего значения *RAS*-ассоциированного генотипа в опухолях прямой кишки, в то время как частота *BRAF*-мутаций градиентно

уменьшалась к дистальным отделам. Высокий уровень микросателлитной нестабильности доминировал в правых отделах ободочной кишки. Относительная частота соматических мутаций в генах *RAS/BRAF* и MSI-High в опухолях различных отделов толстой кишки представлена на рисунке 15.

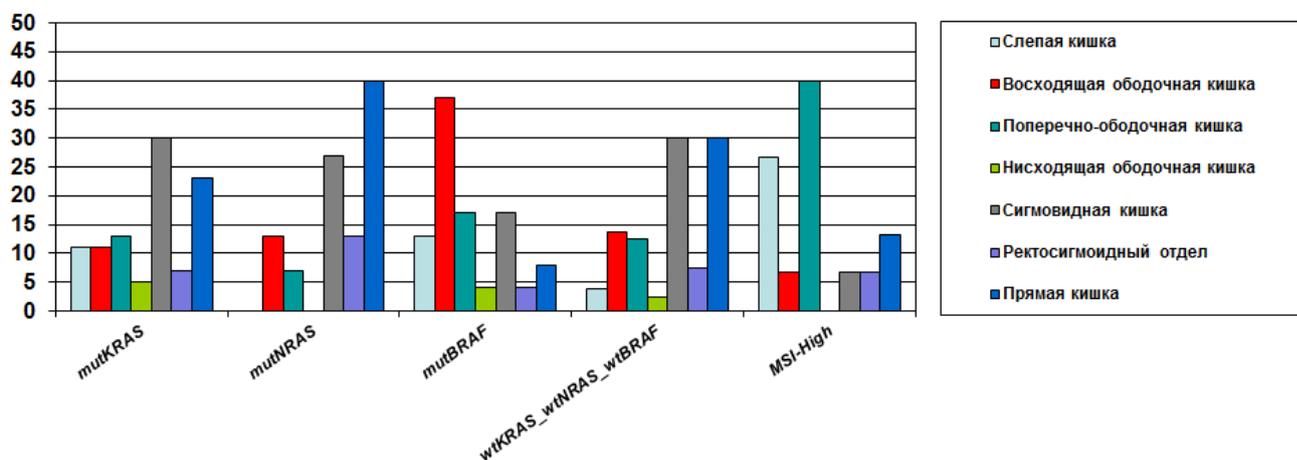


Рисунок 15 - Относительная частота соматических мутаций в генах *RAS/BRAF* и высокого уровня микросателлитной нестабильности в опухолях различных отделов толстой кишки.

Частота соматических *RAS/BRAF*-мутаций и статус микросателлитной нестабильности оценены у пациентов в зависимости от локализации вторичного поражения, т.е. с метастатическим поражением печени, брюшины и легких, а также с локо-регионарными рецидивами (таблица 18). Для изучения корреляции между генотипом опухоли, локализацией очага первичного и вторичного поражения дополнительно оценена частота метастазирования у пациентов с левосторонним, правосторонним раком ободочной кишки и прямой кишки (таблица 19).

Таблица 18 - Частота соматических мутаций в генах *RAS/BRAF*, а также высокого уровня микросателлитной нестабильности в опухолях у больных РТК с метастатическим поражением печени, брюшины, легких, а также локо-регионарным рецидивом.

Локализация mts	Печень (n=82)	Брюшина (n=21)	Легкие (n=27)	Локо- регионарный рецидив (n=17)
<i>mutKRAS</i>	48,8% (n=40)	33,3% (n=7)	59,3% (n=16)	41,2% (n=7)
<i>mutNRAS</i>	8,5% (n=7)	14,3% (n=3)	3,7% (n=1)	5,9% (n=1)
<i>mutBRAF</i>	11,0% (n=9)	23,8% (n=5)	7,4% (n=2)	11,8% (n=2)
<i>MSI-High</i>	8,5% (n=7)	23,8% (n=5)	11,1% (n=3)	23,5% (n=4)

Таблица 19 - Частота метастатического поражения печени, брюшины, легких, а также локо-регионарного рецидива у больных РТК в зависимости от локализации очага первичного поражения.

Локализация mts	Правые отделы ободочной кишки n=34	Левые отделы ободочной кишки n=63	Прямая кишка n=43
Печень	64,7% (n=22)	65,1% (n=41)	44,2% (n=19)
Брюшина	23,5% (n=8)	17,5% (n=11)	4,7% (n=2)
Легкие	11,8% (n=4)	20,6% (n=13)	23,3% (n=10)
Локо-регионарный рецидив	23,5% (n=8)	4,8% (n=3)	14% (n=6)

Наиболее высокая частота метастатического поражения печени отмечена у больных раком ободочной кишки (64,7% и 65,1% для правостороннего и левостороннего рака, соответственно). Вовлечение брюшины зарегистрировано у 23,5% больных раком проксимальной локализации и лишь у 4,7% пациентов с опухолями прямой кишки. Обратная корреляция наблюдалась для вторичного поражения легких – максимальный показатель отмечен у больных раком прямой кишки (23,3%) и минимальный (11,8%) - при правосторонней локализации первичной опухоли. Локо-регионарные рецидивы чаще зафиксированы у больных

РТК проксимальных отделов ободочной кишки (23,5%).

Соматические мутации в гене *KRAS* определены у 59,3% больных с метастазами в легких, в 48,8% случаев – при поражении печени. Патологические *NRAS*- и *BRAF*-генотипы, а также высокий уровень микросателлитной нестабильности с максимальной частотой отмечены при канцероматозе брюшины (14,3%, 23,8% и 23,8%, соответственно).

Частота соматических мутаций в генах *RAS/BRAF* и статус микросателлитной нестабильности в образцах РТК у больных разной возрастной категории

С целью определения различий в соматическом профиле опухолей толстой кишки у больных молодого возраста и старшей возрастной категории все пациенты стратифицированы в две группы: <50 лет и \geq 50 лет.

В нашем исследовании больные в возрасте до 50 лет составили наименьшую группу (n=41; 29,3%). В целом, при сравнении клинико-морфологических данных пациентов обеих групп статистически значимых различий показано не было (таблица 20). Отмечены большая частота правосторонней локализации опухоли у пациентов старше 50 лет и высокий процент РТК III и IV стадий у молодых больных.

Таблица 20 - Клинико-морфологические данные больных спорадической группы в зависимости от возраста манифестации РТК.

Признак	<50 лет (n=41)	\geq50 лет (n=99)
Средний возраст	37,4 лет	62,6 лет
Пол	женский - 53,7% мужской - 46,3%	женский - 49,5% мужской - 50,5%
Локализация	пр ¹ - 19,5% лев ² - 80,5%	пр – 26,3% лев – 73,7%
Гистология	АК ³ - 82,9% МАК ⁴ - 7,3%	АК – 83,8% МАК – 9,0%

Степень дифференцировки	G ⁵ - 2,4%	G1 – 7,1%
	G2 ⁶ - 65,9%	G2 – 58,5%
	G3 ⁷ - 17,1%	G3 – 20,2%
Стадия	I – 0	I – 3,1%
	II – 9,8%	II – 19,2%
	III – 26,8%	III – 23,2%
	IV – 63,4%	IV – 54,5%

Примечания: 1 – правая половина ободочной кишки; 2 – левая половина ободочной кишки и прямая кишка; 3 – аденокарцинома кишечного типа; 4 – муцинозная аденокарцинома; 5 – опухоль высокой степени дифференцировки; 6 – опухоль умеренной степени дифференцировки; 7 – опухоль низкой степени дифференцировки.

При оценке относительной частоты поражения различных отделов толстой кишки опухоли прямой кишки достоверно чаще встречались у пациентов моложе 50 лет (51,2% vs 22,2%, $p < 0.001$) (рисунок 16).

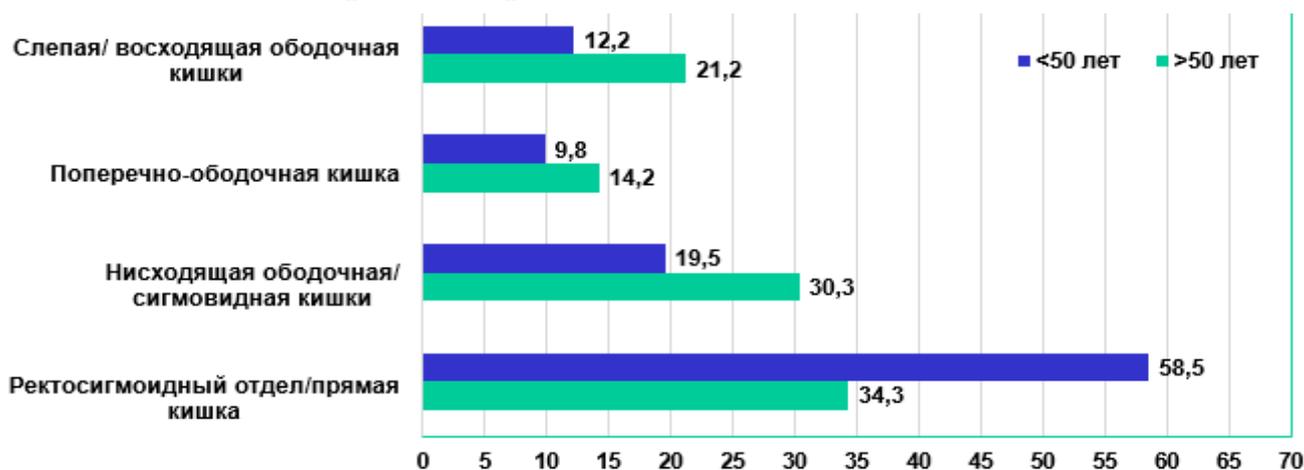


Рисунок 16 - Относительная частота поражения различных отделов толстой кишки у больных генерализованным РТК в зависимости от возрастной категории.

В обеих возрастных группах отмечалась высокая частота соматических мутаций в гене *KRAS* (44,2% и 47,4%, соответственно). Сопоставимые значения отмечены так же и для доли пациентов с *wtRAS/wtBRAF* (37,2%, и 31,6%, соответственно). Обратная корреляция наблюдалась для патологического *NRAS*- и *BRAF*-генотипов. С повышением возраста доля соматических мутаций в гене *BRAF* увеличивалась (7,0% и 13,4%, соответственно), в то время как в гене *NRAS* – снижалась (11,6% и 7,2%, соответственно). Статистической значимости все

выявленные различия не достигли. На рисунке 17 представлена относительная частота соматических мутаций в генах *RAS/BRAF* в опухоли у больных спорадической группы в зависимости от возрастной категории.

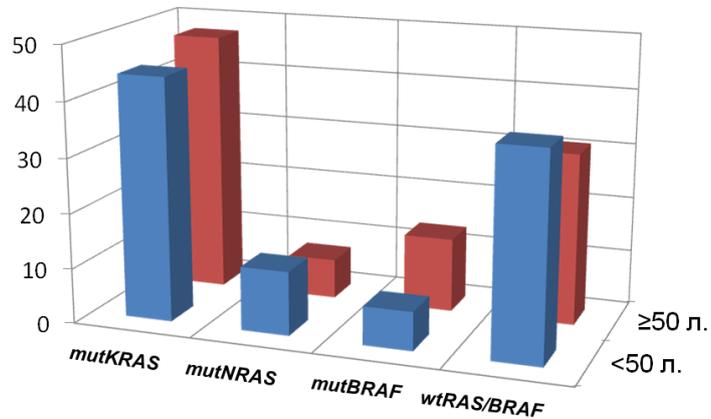


Рисунок 17 - Относительная частота соматических мутаций в генах *RAS/BRAF* в опухоли у больных спорадической группы в зависимости от возрастной категории.

При оценке статуса микросателлитной нестабильности различий в исследуемых группах, в т.ч. статистически значимых, не выявлено. MSI-High в образцах опухолевой ткани диагностирован с сопоставимой частотой у больных моложе и старше 50-летнего возраста (11,6% и 10,3%, соответственно). На рисунке 18 представлена относительная частота образцов опухоли с MSS/MSI-Low и MSI-High у больных спорадической группы в зависимости от возраста.

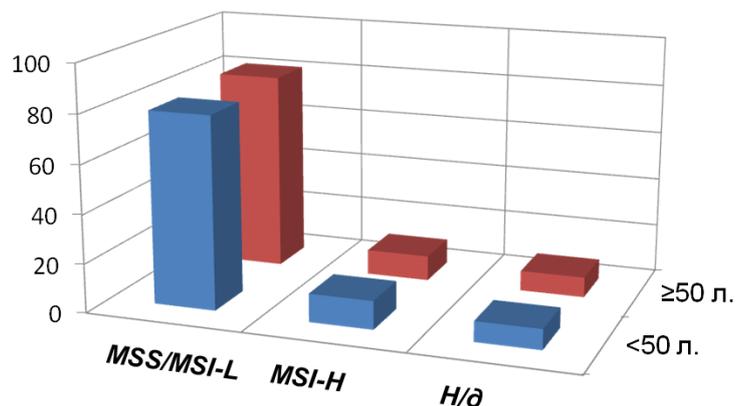


Рисунок 18 - Относительная частота образцов опухоли с MSS/MSI-Low и MSI-High у больных спорадической группы в зависимости от возрастной категории.

Частота соматических мутаций в генах *RAS/BRAF* и статус микросателлитной нестабильности в образцах опухоли больных генерализованным РТК в зависимости от стадии на момент постановки диагноза

У трех больных I стадией РТК отмечен возврат заболевания и подтвержден мутантный тип генов *RAS*. Частота соматических мутаций в опухоли у больных II и III стадией РТК была сопоставима и составила 56,5% и 55,9%, соответственно. Каждый третий пациент с IV стадией РТК являлся носителем патологического опухолевого *RAS/BRAF*-генотипа (таблица 21). Для частоты микросателлитной нестабильности в образцах РТК отмечена обратная корреляция со стадией заболевания (таблица 21).

Таблица 21 - Частота соматических мутаций в генах *RAS/BRAF* и статус микросателлитной нестабильности в образцах опухоли больных генерализованным РТК в зависимости от стадии на момент постановки диагноза.

	I стадия n=3	II стадия n=23	III стадия n=34	IV стадия n=80
<i>mutKRAS</i>	2 (66,7%)	11 (47,8%)	14 (41,2%)	38 (47,5%)
<i>mutNRAS</i>	-	-	3 (8,8%)	8 (10%)
<i>mutBRAF</i>	1 (33,3%)	2 (8,7%)	2 (5,9%)	12 (15%)
	100%	56,5%	55,9%	72,5%
MSI-High	-	3 (13,0%)	4 (11,8%)	8 (10%)

3.1.3 Оценка выживаемости больных генерализованным РТК

В нашем исследовании выполнен однофакторный регрессионный анализ Кокса и тест log-rank для оценки факторов риска прогрессирования у больных генерализованным РТК с учетом следующих независимых переменных: пол (мужской vs женский), возраст (<50 vs ≥50 и <65 vs ≥65), сторона поражения (правая половина ободочной кишки vs левая половина ободочной кишки/прямая кишка), степень дифференцировки опухоли (G1/G2 vs G3), гистологический вариант (аденокарцинома кишечного типа vs муцинозная аденокарцинома/перстневидноклеточный рак), стадия на момент постановки

диагноза (I, II, III стадии vs IV стадия и I, II стадии vs III, IV стадии), число зон отдаленного метастазирования (одна vs две и более), метастатическое поражение брюшины (да vs нет), лекарственное лечение (химиотерапия vs таргетная терапия/химиотерапия), хирургическое лечение (полная циторедукция vs неполная циторедукция vs отсутствие хирургического вмешательства), статус гена *KRAS* (mut vs wt), статус гена *NRAS* (mut vs wt), статус гена *BRAF* (mut vs wt), статус микросателлитной нестабильности (MSI-High vs MSS/MSI-Low). Результаты однофакторного анализа представлены в таблицах 22 и 23.

Таблица 22 - Результаты однофакторного анализа с помощью теста log-rank для оценки факторов риска прогрессирования у больных генерализованным раком толстой кишки.

		Медиана, мес.	95% CI ¹	p
Возраст	<50 лет	12,0	9,154-14,846	0.655
	≥50 лет	11,0	9,579-12,421	
Возраст	<65 лет	12,0	11,004-12,996	0.044
	≥65 лет	9,0	7,885-10,115	
Пол	мужской	12,0	10,467-13,533	0.344
	женский	11,0	9,388-12,612	
Сторона поражения	правая	11,0	7,886-14,114	0.193
	левая	12,0	10,760-13,240	
Гистологический вариант	АК ²	12,0	10,807-13,193	0.578
	МАК ³ /ПКР ⁴	9,0	5,872-12,128	
Степень дифференцировки	G1 ⁵ /G2 ⁶	11,0	9,886-12,114	0.591
	G3 ⁷	11,0	6,715-15,285	
Стадия	I/II/III	12,0	10,678-13,322	0.537
	IV	10,0	8,128-11,872	
Стадия	I/II	12,0	9,049-18,951	0.638
	III/IV	11,0	9,664-12,336	
Зоны метастазирования	1	12,0	10,759-13,241	0.189
	2 и более	10,0	7,487-12,513	
Mts (брюшина)	да	8,0	6,011-9,989	0.048
	нет	12,0	10,822-13,178	
Лекарственное лечение	ПХТ ⁸	10,0	8,257-11,743	0.687
	ХТ/ТТ ⁹	12,0	11,170-12,830	

Хирургическое лечение	Полная ЦР ^{10*}	17,0	12,280-21,720	0.001/ <0.001
	Неполная ЦР	9,0	7,687-10,313	
	Без хирург. лечения	10,0	8,047-11,953	
<i>KRAS</i>	mut ¹¹	11,0	8,781-13,219	0.011
	wt ¹²	12,0	9,000-15,000	
<i>NRAS</i>	mut	14,0	5,083-22,917	0.958
	wt	11,0	9,884-12,116	
<i>BRAF</i>	mut	6,0	3,737-8,263	0.006
	wt	12,0	10,847-13,153	
MSI	MSS/MSI-Low	12,0	10,723-13,277	0.005
	MSI-High	7,0	4,095-9,095	

Примечания: 1 - confidence interval – доверительный интервал; 2 – аденокарцинома кишечного типа; 3 – медуллярная аденокарцинома; 4 – перстневидноклеточный рак; 5 – высокая степень дифференцировки; 6 – средняя степень дифференцировки; 7 – низкая степень дифференцировки; 8 – химиотерапия; 9 - таргетная терапия; 10 – циторедукция; 11 – мутантный тип гена; 12 – «дикий» тип гена; * - опорная категория.

Таблица 23 - Результаты однофакторного регрессионного анализа для оценки факторов риска прогрессирования у больных генерализованным раком толстой кишки.

	Однофакторный анализ (регрессия Кокса)		
	HR ¹	95% CI ²	p
Возраст (≥ 50 лет)	1.104	0.697-1.751	0.673
Возраст (≥ 65 лет)	1.613	0.985-2.643	0.058
Пол (жен ³)	1.295	0.797-1.863	0.361
Сторона поражения (пр ⁴)	1.363	0.832-2.232	0.218
Гистологический вариант (МАК ⁵ /ПКР ⁶)	1.237	0.565-2.711	0.595
Степень дифференцировки (G3 ⁷)	1.188	0.701-2.011	0.522
Стадия (IV)	1.138	0.739-1.752	0.558
Стадия (III/IV)	1.148	0.623-2.117	0.658

2 и более зоны метастазирования	1.340	0.846-2.125	0.213
Mts (брюшина)	1.694	0.968-2.963	0.065
Лекарственное лечение (ТТ⁸)	0.914	0.575-1.451	0.702
Хирургическое лечение (полная ЦР⁹)	0.332	0.197-0.561	<0.001
Хирургическое лечение (неполная ЦР)	0.802	0.471-1.365	0.417
<i>mutKRAS</i>	1.694	1.097-2.615	0.017
<i>mutNRAS</i>	1.026	0.373-2.820	0.960
<i>mutBRAF</i>	2.513	1.236-5.110	0.011
MSI-High	2.332	1.227-4.435	0.010

Примечания: 1 – hazard ratio – отношение рисков; 2 - confidence interval – доверительный интервал; 3 – женский пол; 4 – правая половина ободочной кишки; 5 – медулярная аденокарцинома; 6 – перстневидноклеточный рак; 7 – низкая степень дифференцировки; 8 – таргетная терапия; 9 – циторедукция.

При однофакторном анализе для следующих предикторов показано независимое влияние на риск наступления прогрессирования у больных генерализованным РТК: возраст больных (≥ 65 лет), метастатическое поражение брюшины, хирургическое лечение в объеме полной циторедукции, наличие соматических мутаций в генах *KRAS* и *BRAF*, высокий уровень микросателлитной нестабильности (MSI-High). Данные переменные введены в множественную модель. Результаты многофакторного регрессионного анализа представлены в таблице 24.

Таблица 24 - Результаты многофакторного регрессионного анализа для оценки факторов риска прогрессирования заболевания у больных генерализованным раком толстой кишки.

	Многофакторный анализ (регрессия Кокса)		
	HR¹	95% CI²	p
Возраст (≥ 65 лет)	1.526	0.853-2.729	0.154
Mts (брюшина)	1.322	0.634-2.754	0.457
Хирургическое лечение (полная ЦР³)	0.340	0.196-0.590	<0.001
<i>mutKRAS</i>	2.149	1.255-3.679	0.005
<i>mutBRAF</i>	4.100	1.802-9.325	0.001
MSI-High	2.481	1.273-4.837	0.008

Примечания: 1 - hazard ratio – отношение рисков; 2 - confidence interval – доверительный интервал; 3 - циторедукция.

Показатель -2LL для базовой модели составил 630,022, значение данного показателя для модели с предикторами значимо ниже (-2LL 594,263, χ^2 -модели 44,337, $p < 0.001$), т.е. предложенная модель обладает высокой предсказательной способностью. При проведении регрессионного анализа Кокса соблюдены следующие необходимые условия: неколлинеарности предикторов, пропорциональности рисков, линейности влияния переменных на логарифм функции риска наступления события. В нашем исследовании для всех предикторов, включенных в многофакторный анализ, за исключением метастатического поражения брюшины и возраста манифестации РТК старше 65 лет, показана ассоциация с уменьшением времени дожития относительно исхода и подтвержден независимый прогностический вклад в риск развития прогрессирования основного заболевания у больных генерализованным РТК.

Оценка вероятности выживания без прогрессирования выполнена с помощью метода Каплан-Майера. На рисунках 19-21 представлены графики выживаемости без прогрессирования больных генерализованным РТК в зависимости от молекулярных предикторов: соматического профиля генов *RAS* и *BRAF*, статуса микросателлитной нестабильности. В соответствующих таблицах

25-27 представлены данные 6-ти, 12-ти и 18-ти месячной ВБП, а также значения медианы времени до прогрессирования больных генерализованным РТК.

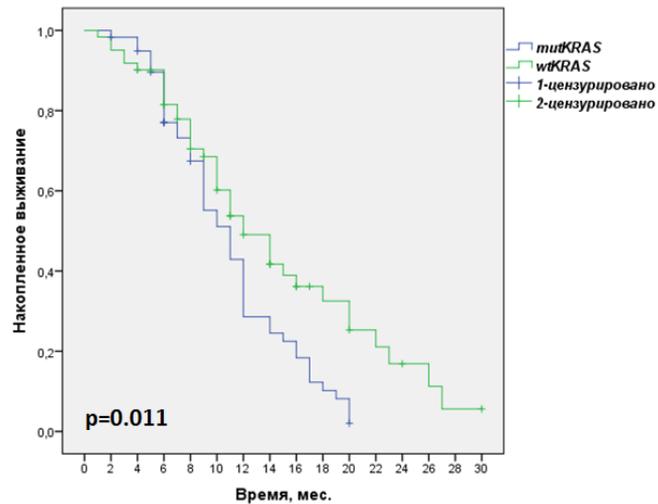


Рисунок 19 - Выживаемость без прогрессирования больных генерализованным РТК в зависимости от *KRAS*-статуса опухоли.

Таблица 25 - 6-, 12- и 18-месячная ВБП, а также медиана выживаемости больных генерализованным РТК в зависимости от *KRAS*-статуса опухоли.

N=120	6 мес.	12 мес.	18 мес.	Медиана
<i>mutKRAS</i>	77,0%	28,6%	10,2%	11,0 мес.
<i>wtKRAS</i>	81,5%	49,1%	32,5%	12,0 мес.

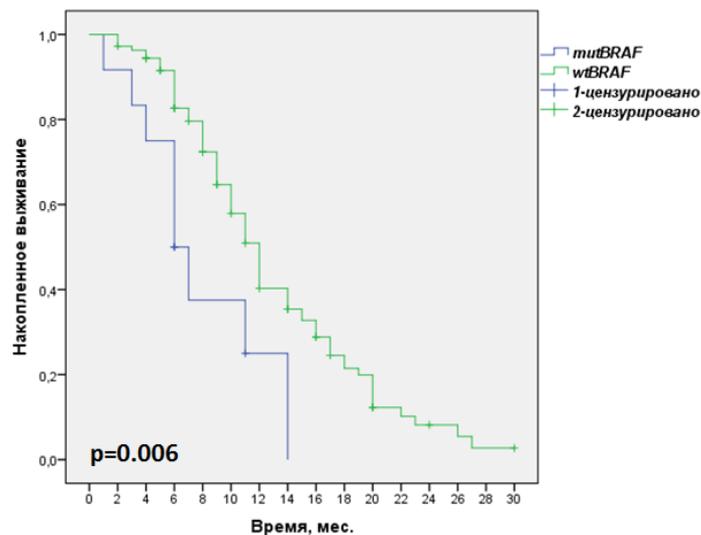


Рисунок 20 - Выживаемость без прогрессирования больных генерализованным РТК в зависимости от *BRAF*-статуса опухоли.

Таблица 26 - 6-, 12- и 18-месячная ВБП, а также медиана выживаемости больных генерализованным РТК, в зависимости от *BRAF*-статуса опухоли.

N=120	6 мес.	12 мес.	18 мес.	Медиана
<i>mutBRAF</i>	50,0%	25,0%	-	6,0 мес.
<i>wtBRAF</i>	82,7%	40,3%	21,5%	12,0 мес.

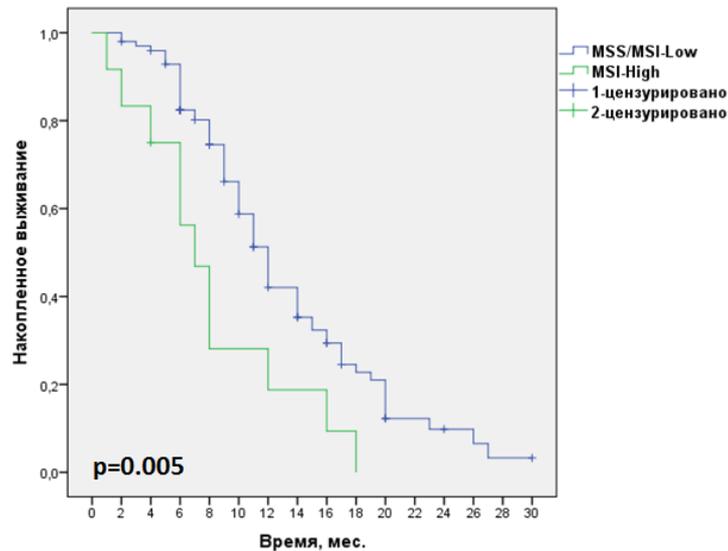


Рисунок 21 - Выживаемость без прогрессирования больных генерализованным РТК в зависимости от статуса микросателлитной нестабильности в опухоли.

Таблица 27 - 6-, 12- и 18-месячная ВБП, а также медиана выживаемости больных генерализованным РТК, в зависимости от статуса микросателлитной нестабильности в опухоли.

N=111	6 мес.	12 мес.	18 мес.	Медиана
MSS/MSI-Low	82,4%	42,1%	22,8%	12,0 мес.
MSI-High	56,3%	18,8%	-	7,0 мес.

На рисунке 22 и в таблице 28 представлен график и данные выживаемости больных, стратифицированных в зависимости от *RAS/BRAF*-генотипа опухоли. Дополнительный анализ ВБП выполнен в группе больных микросателлитно-стабильным РТК с учетом соматического профиля генов *RAS/BRAF* (рисунок 23, таблица 29). Аналогичный анализ не представлен для пациентов с MSI-High-ассоциированным колоректальным раком в связи с малочисленностью представленной группы больных (n=15).

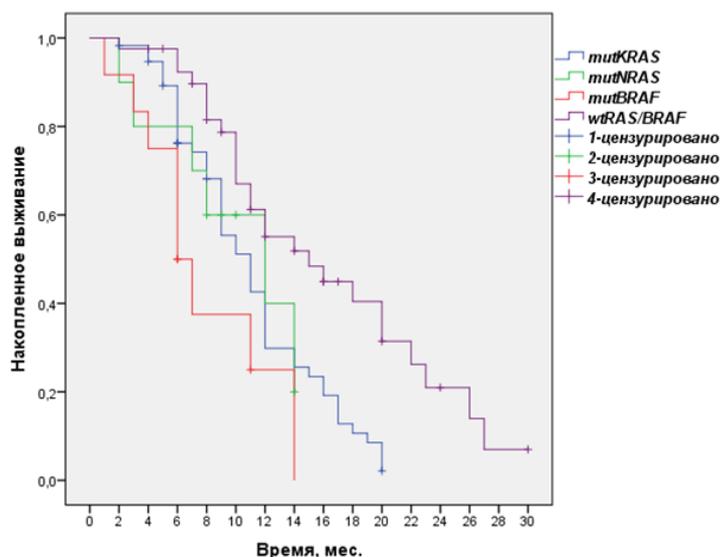


Рисунок 22 - Выживаемость без прогрессирования больных генерализованным РТК в зависимости от *RAS/BRAF*-статуса опухоли.

Таблица 28 - 6-, 12- и 18-месячная ВБП, а также медиана выживаемости больных генерализованным РТК, в зависимости от *RAS/BRAF*-статуса опухоли.

N=120	6 мес.	12 мес.	18 мес.	Медиана
<i>KRAS</i>	76,2%	29,8%	10,7%	11,0 мес.
<i>NRAS</i>	80,0%	40,0%	20,0%	12,0 мес.
<i>BRAF</i>	50,0%	25,0%	-	6,0 мес.
<i>wtRAS/BRAF</i>	92,3%	55,1%	40,4%	15,0 мес.
Парные сравнения				
	<i>KRAS</i>	<i>NRAS</i>	<i>BRAF</i>	<i>wtRAS/BRAF</i>
	р	р	р	р
<i>KRAS</i>		0.958	0.055	0.001
<i>NRAS</i>	0.958		0.194	0.134
<i>BRAF</i>	0.055	0.194		0.001
<i>wtRAS/BRAF</i>	0.001	0.134	0.001	

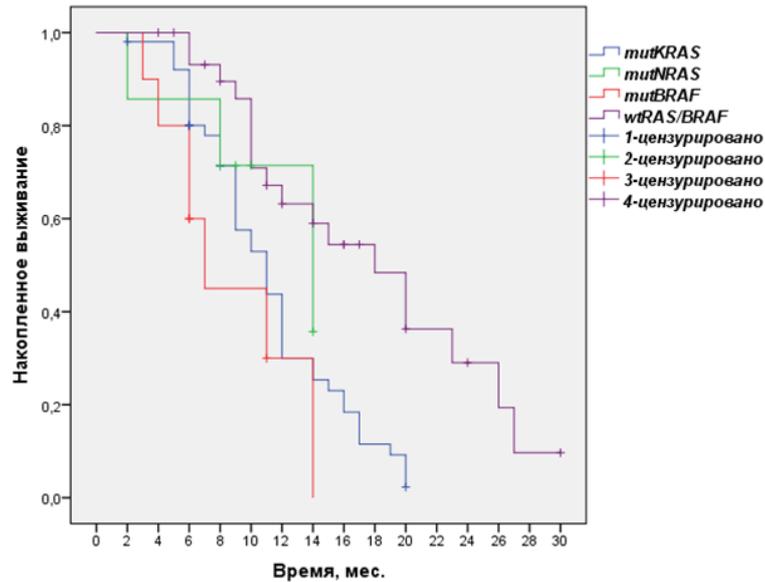


Рисунок 23 - Выживаемость без прогрессирования больных генерализованным MSS-ПТК в зависимости от *RAS/BRAF*-статуса опухоли.

Таблица 29 - 6-, 12- и 18-месячная ВБП, а также медиана выживаемости больных генерализованным MSS-ПТК, в зависимости от *RAS/BRAF*-статуса опухоли.

N=99	6 мес.	12 мес.	18 мес.	Медиана
<i>MSS/KRAS</i>	80,0%	29,9%	11,5%	11,0 мес.
<i>MSS/NRAS</i>	85,7%	85,7%	35,7%	14,0 мес.
<i>MSS/BRAF</i>	60,0%	30,0%	-	7,0 мес.
<i>wtRAS/BRAF</i>	93,1%	63,2%	48,4%	18,0 мес.
Парные сравнения				
	<i>MSS/ mutKRAS</i>	<i>MSS/ mutNRAS</i>	<i>MSS /mutBRAF</i>	<i>MSS/wtRAS/ BRAF</i>
	p	p	p	p
<i>MSS/KRAS</i>		0.519	0.152	0.000
<i>MSS/NRAS</i>	0.519		0.158	0.400
<i>MSS/BRAF</i>	0.152	0.158		0.002
<i>MSS/wtRAS/BRAF</i>	0.000	0.400	0.002	

При оценке вероятности выживания без прогрессирования у больных различной возрастной категории достоверные различия получены при возрастной стратификации 65 лет. На рисунках 24 и 25 представлены графики выживаемости, в соответствующих таблицах 30 и 31 - данные 6-ти, 12-ти и 18-ти месячной ВБП, а

также медиана выживаемости больных генерализованным РТК моложе и старше 50 лет и 65 лет на момент постановки диагноза.

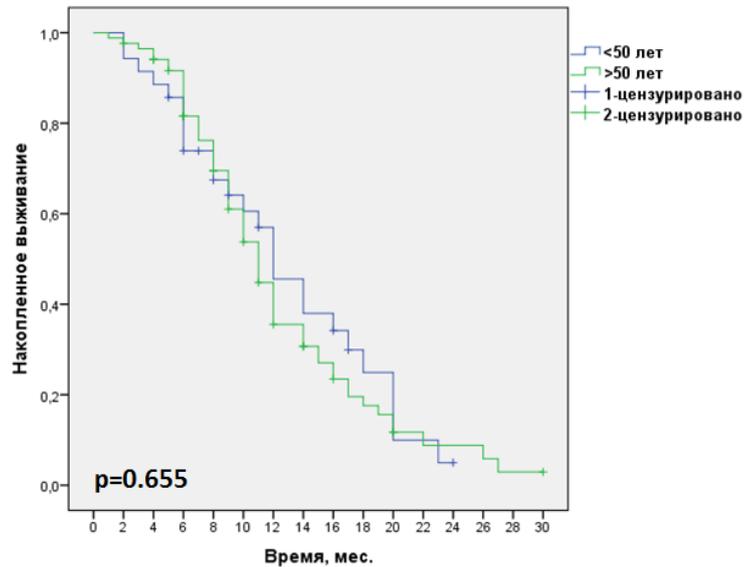


Рисунок 24 - Выживаемость без прогрессирования больных генерализованным РТК моложе и старше 50 лет на момент постановки диагноза.

Таблица 30 - 6-, 12- и 18-месячная ВБП, а также медиана выживаемости больных генерализованным РТК моложе и старше 50 лет на момент постановки диагноза.

N=120	6 мес.	12 мес.	18 мес.	Медиана
< 50 лет	73,9%	45,6%	24,9%	12,0 мес.
≥ 50 лет	81,6%	35,5%	17,6%	11,0 мес.

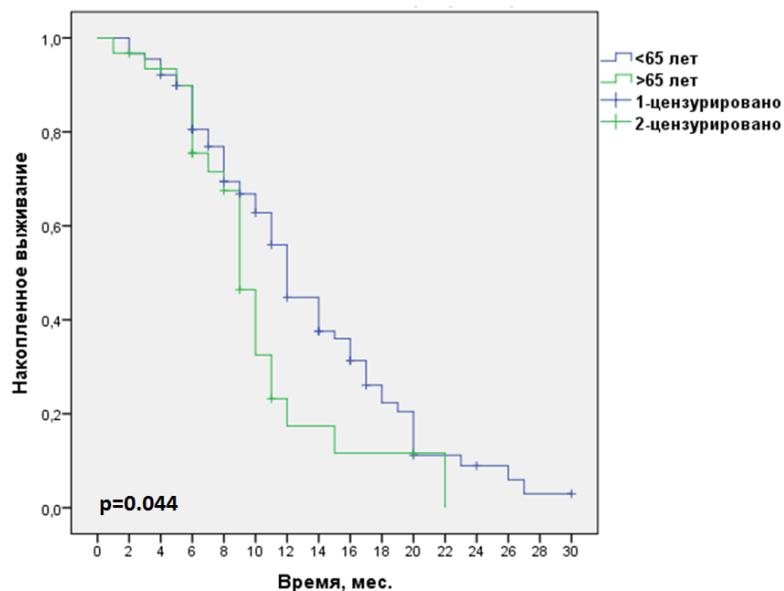


Рисунок 25 - Выживаемость без прогрессирования больных генерализованным РТК моложе и старше 65 лет на момент постановки диагноза.

Таблица 31 - 6-, 12- и 18-месячная ВБП, а также медиана выживаемости больных генерализованным РТК моложе и старше 65 лет на момент постановки диагноза.

N=120	6 мес.	12 мес.	18 мес.	Медиана
< 65 лет	80,5%	44,8%	22,4%	12,0 мес.
≥ 65 лет	75,5%	17,4%	11,6%	9,0 мес.

Наилучший показатель медианы выживаемости без прогрессирования в зависимости от локализации очага первичного поражения отмечен у пациентов с раком прямой кишки (рисунок 25 и таблица 30).

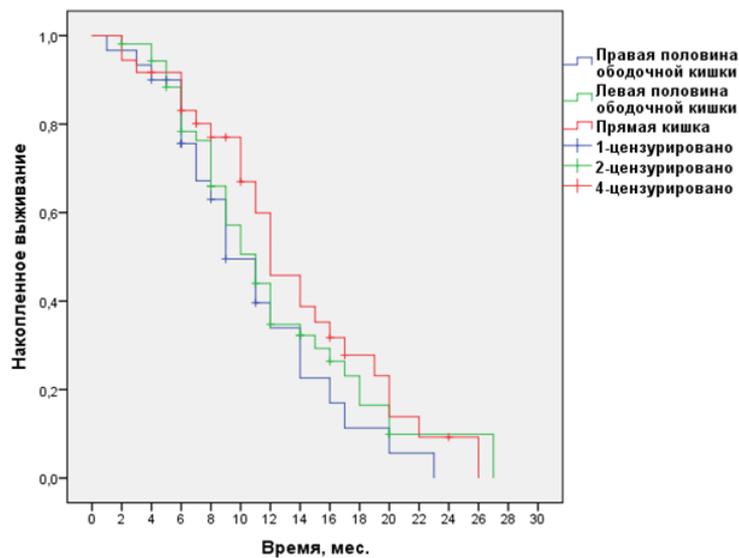


Рисунок 25 - Выживаемость без прогрессирования больных генерализованным РТК в зависимости от локализации первичного поражения.

Таблица 30 - 6-, 12- и 18-месячная ВБП, а также медиана выживаемости больных генерализованным РТК в зависимости от локализации первичного поражения.

N=119	6 мес.	12 мес.	18 мес.	Медиана
Правые отделы ободочной кишки	75,6%	33,9%	11,3%	9,0 мес.
Левые отделы ободочной кишки	78,3%	34,7%	16,5%	11,0 мес.
Прямая кишка	83,1%	45,8%	27,8%	12,0 мес.

	Парные сравнения		
	Правые отделы ободочной кишки	Левые отделы ободочной кишки	Прямая кишка
	р	р	р
Правые отделы ободочной кишки	-	0.420	0.103
Левые отделы ободочной кишки	0.420	-	0.419
Прямая кишка	0.103	0.419	-

Пациенты с метастатическим поражением брюшины достоверно уступили в показателях выживаемости без прогрессирования больным с иной локализацией вторичных очагов (рисунок 26 и таблица 31).

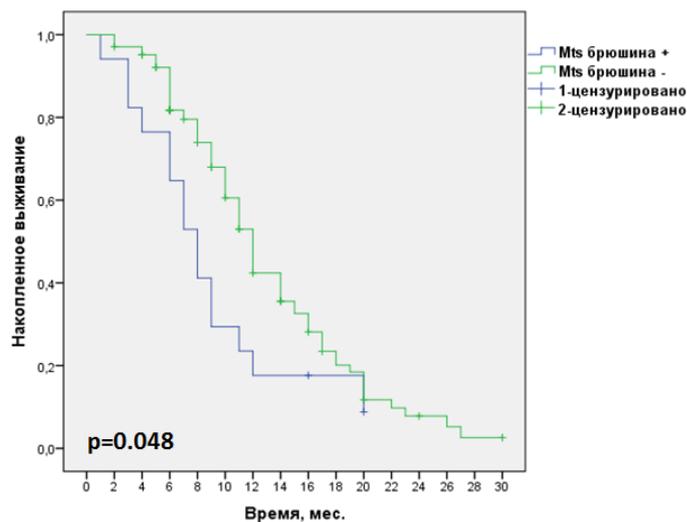


Рисунок 26 - Выживаемость без прогрессирования больных генерализованным РТК в зависимости от метастатического поражения брюшины.

Таблица 31 - 6-, 12- и 18-месячная ВВП, а также медиана выживаемости больных генерализованным РТК в зависимости от метастатического поражения брюшины.

N=120	6 мес.	12 мес.	18 мес.	Медиана
Mts брюшина +	64,7%	17,6%	17,6%	8,0 мес.
Mts брюшина -	81,7 %	42,4%	20,1%	12,0 мес.

Больные генерализованным РТК, перенесшие хирургическое лечение в объеме полной циторедукции, характеризовались достоверно лучшими показателями ВБП. Пациенты с неполным циторедуктивным оперативным вмешательством, а также больные без включения хирургического этапа в план лечения показали сопоставимые значения ВБП (рисунок 27, таблица 32).

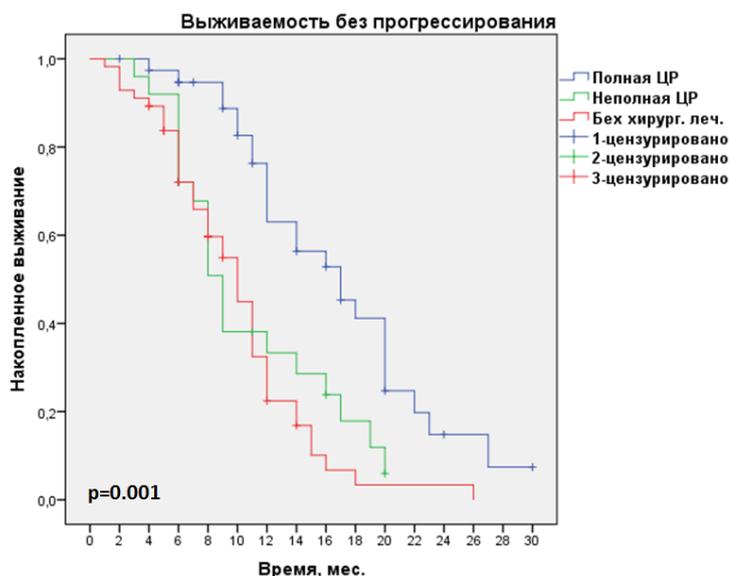
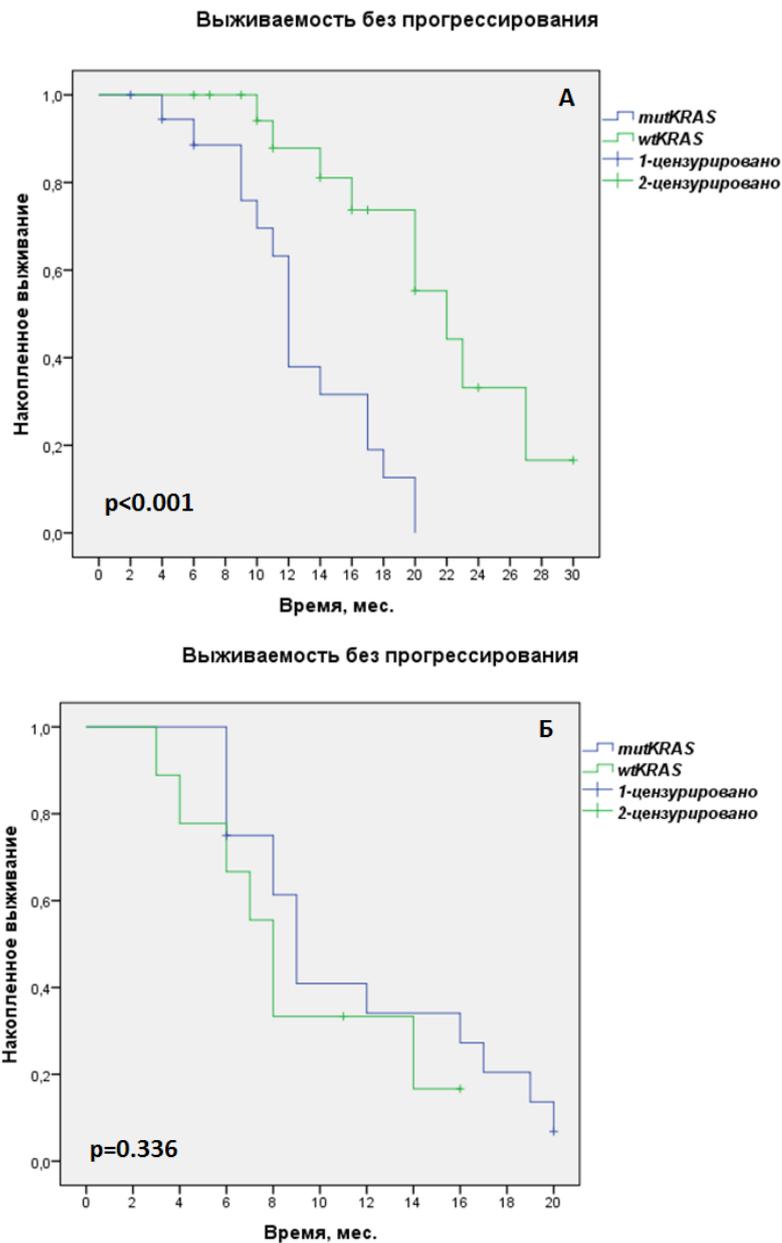


Рисунок 27 - Выживаемость без прогрессирования больных генерализованным РТК в зависимости от объема хирургического лечения.

Таблица 32 - 6-, 12- и 18-месячная ВБП, а также медиана выживаемости больных генерализованным РТК в зависимости от объема хирургического лечения.

N=120	6 мес.	12 мес.	18 мес.	Медиана
Полная ЦР	94,7%	63,0%	41,2%	17,0 мес.
Неполная ЦР	72,0%	33,4%	17,9%	9,0 мес.
Без хирург. лечения	72,0%	22,5%	3,4%	10,0 мес.
Парные сравнения				
	Полная ЦР	Неполная ЦР	Без хирург. лечения	
	р	р	р	
Полная ЦР	-	0.001	0.000	
Неполная ЦР	0.001	-	0.423	
Без хирург. лечения	0.000	0.423	-	

В группе больных с *KRAS*-ассоциированным РТК дополнительно оценено влияние оперативного лечения на ВБП. Пациенты с отсутствием активирующих мутаций в гене *KRAS* при условии хирургического вмешательства в объеме полной циторедукции демонстрировали самую продолжительную медиану времени без прогрессирования – 22 месяца, что в два раза превышает аналогичный показатель в группе больных с мутантным *KRAS*-статусом. Пациенты с неполной циторедукцией и при невозможности применения хирургического пособия достоверно не отличались в ВБП независимо от *KRAS*-генотипа (рисунок 28, таблица 33).



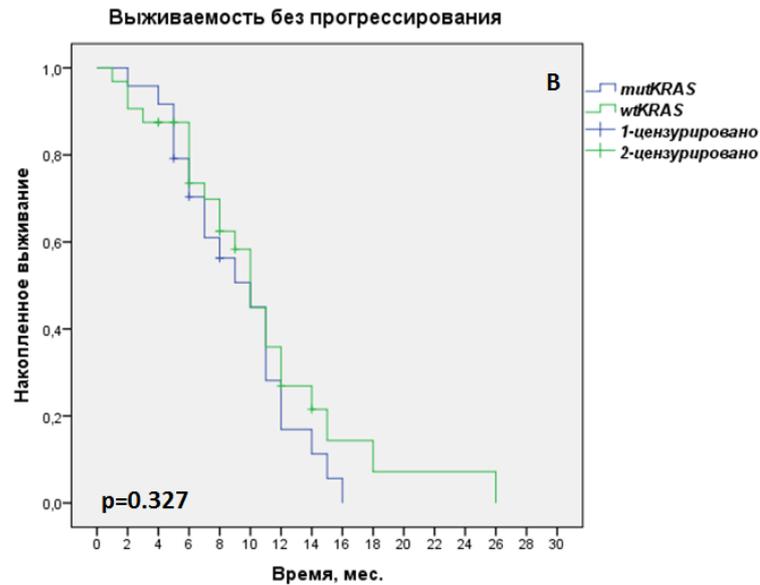


Рисунок 28 - Выживаемость без прогрессирования больных генерализованным РТК в зависимости от *KRAS*-статуса опухоли и объема хирургического лечения (А – полная циторедукция; Б – неполная циторедукция; В – без хирургического лечения).

Таблица 33 - 6-, 12- и 18-месячная ВБП, а также медиана выживаемости больных генерализованным РТК в зависимости от *KRAS*-статуса опухоли и объема хирургического лечения.

N=120		6 мес.	12 мес.	18 мес.	Медиана
Полная ЦР	<i>mutKRAS</i>	88,5%	37,9%	12,6%	12,0 мес.
	<i>wtKRAS</i>	100,0%	87,8%	73,7%	22,0 мес.
Неполная ЦР	<i>mutKRAS</i>	75,0%	34,1%	20,5%	9,0 мес.
	<i>wtKRAS</i>	66,7%	33,3%	-	8,0 мес.
Без хирург. лечения	<i>mutKRAS</i>	70,4%	16,9%	-	10,0 мес.
	<i>wtKRAS</i>	73,5%	26,5%	7,2%	10,0 мес.

3.2. Изучение клинико-генетических характеристик наследственного рака толстой кишки

3.2.1. ДНК-генотипирование герминальных мутаций в генах *MLH1* и *MSH2*

Молекулярно-генетическая диагностика на предмет наличия герминальных мутаций в генах системы репарации неправильно спаренных оснований *MLH1* и *MSH2* выполнена для 117 больных, клинико-морфологические и анамнестические

данные которых соответствовали пересмотренным рекомендациям Бетезда. Для 99 пациентов ДНК-диагностика проводилась стандартными методами (HRM или CSGE) с последующим капиллярным секвенированием по Сэнгеру. Таргетное секвенирование с применением разработанной диагностической панели генов, участвующих в канцерогенезе ЗНО ЖКТ, на платформе 454 Roche Junior, выполнено 18 (15%) больным. Все выявленные варианты методом NGS подтверждены секвенированием по Сэнгеру.

При оценке первичной структуры кодирующей части генов *MLH1* и *MSH2* патогенные клинически-значимые герминальные мутации выявлены у 30 больных (25,6%), в гене *MLH1* – у 17 пациентов (56,6%), в гене *MSH2* - у 13 больных (43,4%). Перечень диагностированных мутаций представлен в таблицах 34 и 35.

Таблица 34 - Перечень диагностированных мутаций в гене *MLH1*.

Protein	Coding	Экзон/ интрон	rs (dbSNP)
Ala21Glu	62C>A	1 экзон	rs63750706
-	117-2A>G ¹	2 интрон	rs267607712
	207+5A>G	2 интрон	-
Phe80_Thr81del	228_233delTTCACCT	3 экзон	-
Thr117Lys	350C>A	4 экзон	-
Leu177Trpfs*24	530delT	6 экзон	-
	546-2A>G	6 интрон	rs267607759
Arg226Ter	676C>T	8 экзон	rs63751615
Arg226Leu	677G>T	8 экзон	rs63751711
Ala282Serfs*24	844dupA	10 экзон	-
Leu323Trpfs*44	967delC	11 экзон	-
Lys618del	1852_1854delAAG	16 экзон	rs63751247
Pro640His	1919C>A	17 экзон	-
-	1989+2T>G ¹	17 интрон	-
Glu669Ter	2005G>T	18 экзон	-

Примечание - 1 - мутация, выявленная у двух больных.

Таблица 35 - Перечень диагностированных мутаций в гене *MSH2*.

Protein	Coding	Экзон/ интрон	rs (dbSNP)
-	942+3A>T	5 интрон	rs193922376
Leu376Ilefs*37	1125_1126insAT	7 экзон	rs786203350
Arg406Ter	1216C>T	7 экзон	rs63751108
Gln419Ter	1255C>T	7 экзон	rs63750006
Leu458Ter	1373delT	8 экзон	rs63750521
Leu595Arg	1784T>G	12 экзон	rs786201590
Asn596del	1786_1788delAAT	12 экзон	rs63749831
Arg621Ter ¹	1861C>T	12 экзон	rs63750508
Pro696Ser	2086C>T	13 экзон	rs587779136
Met726Ile	2178G>C	13 экзон	rs587782396
Leu744Ter	2231T>G	14 экзон	rs63750403
Gln816Ter	2446C>T	14 экзон	rs63749917

Примечание - 1 - мутация, выявленная у двух больных.

В генах MMR герминальные мутации диагностировались на протяжении всей кодирующей части и, за исключением трех мутаций, были диагностированы единично. В структуре перестроений в гене *MLH1* доминировали мутации со сдвигом рамки считывания и миссенс-мутации, в то время как подавляющее большинство случаев патологического *MSH2*-генотипа было обусловлено нонсенс-мутациями, т.е. формированием преждевременного стоп-кодона (рисунок 29).



Рисунок 29 - Спектр герминальных мутаций, диагностированных в генах *MLH1* и *MSH2*.

Примеры фрагментов сиквенса генов *MLH1* и *MSH2*, содержащих патологическую последовательность, представлены на рисунке 30 (А – *mutMLH1* с.117-2A>G; Б – *mutMLH1* с.844dupA; В - *mutMSH2* с.1373delT, Г - *mutMSH2* с.1861C>T).

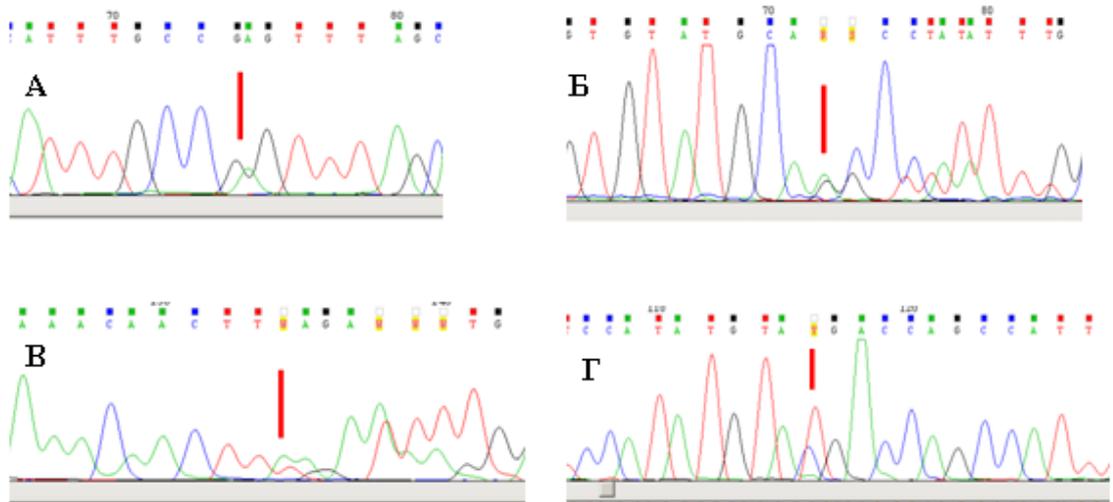


Рисунок 30 - Фрагменты сиквенса генов *MLH1* и *MSH2*, содержащих патологическую последовательность (А – *mutMLH1* с.117-2A>G; Б – *mutMLH1* с.844dupA; В - *mutMSH2* с.1373delT, Г - *mutMSH2* с.1861C>T).

Все герминальные мутации в гене *MSH2* и шесть мутаций в гене *MLH1* зарегистрированы в международной базе данных dbSNP как патогенные клинически значимые варианты. Для незарегистрированных герминальных мутаций и вариантов с неизвестным клиническим значением, функциональная

значимость оценивалась с помощью аналитических программ SIFT, Provean и Mutation Taster (для миссенс- и нонсенс-мутаций); Human Splicing Finder и Mutation Taster (для делеций и инсерций со сдвигом/без сдвига рамки считывания, мутаций сайта-сплайсинга). Примеры анализа клинической значимости выявленных мутаций представлены на рисунках 31-33.

Results

Sequences

Reference sequence *MLH1* Gene - ENST00000231790 Transcript

```
1 gggatTTTT ttoctggatt aaatcaagaa satgggaatt caaagagatt tggaaaaatg agtaaacatga ttatttactc atcttttgg tctataacag
101 AAAGAAAGATC TGGATATTGT ATGTGAAAAG TTCACTACTA GTAAACTGCA GTCCTTTGAG GATTAGCCA GTATTCTAC CTATGGCTTT CGAGGTGAGG
201 taagctaaag attcaagaaa tgtgtaaaat sttoctcctgt gatgcacatt totgtcattt gttagatagt atttctcaac atagataaat asggtttgg
Total sequence length: 299 nucleotides
```

Mutant sequence Deletion at position 1316 nucleotides deleted)

```
1 gggatTTTT ttoctggatt aaatcaagaa satgggaatt caaagagatt tggaaaaatg agtaaacatga ttatttactc atcttttgg tctataacag
101 AAAGAAAGATC TGGATATTGT ATGTGAAAAG -----ACTA GTAAACTGCA GTCCTTTGAG GATTAGCCA GTATTCTAC CTATGGCTTT CGAGGTGAGG
201 taagctaaag attcaagaaa tgtgtaaaat sttoctcctgt gatgcacatt totgtcattt gttagatagt atttctcaac atagataaat asggtttgg
Total sequence length: 299 nucleotides
```

The sequences analyzed in HSF are underlined.

Interpreted Data

This table shows only relevant results related to the mutation position and context. The mutation occurs in the late exonic positions, the following table show results of donor splice sites, ESE and ESS that could be affected by the mutation.

Predicted signal	Prediction algorithm	cDNA Position	Interpretation
ESE Site Broken	1 - ESE-Finder - SRp40		Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.
	2 - HSF Matrices - 9GB		
	3 - ESE-Finder - SC35		
	4 - EIEs from Zhang et al.		

Raw Data Tables

2013/2018 © Human Splicing Finder - Bioinformatics & Genetics Team - All rights reserved
 Inserm UMR 1221 - Aix-Marseille Université, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05

Рисунок 31 – Анализ функциональной значимости герминальной мутации с.228_233delTTCACT в 3 экзоне гена *MLH1* с помощью программы Human Splicing Finder.

J. Craig Venter INSTITUTE **PROVEAN**

PROVEAN Tools
 PROVEAN Protein
 PROVEAN Protein Batch
 Human
 Mouse
 PROVEAN Genome Variants
 Human
 Mouse

PROVEAN Genome Variants Result - Full version (Download)

Database: human37_66

Note: For each variant all protein isoforms are shown.

VARIATION	PROTEIN SEQUENCE CHANGE								
ROW_NO	INPUT	PROTEIN_ID	LENGTH	STRAND	COOON_CHANGE	POS	RESIDUE_REF	RESIDUE_ALT	TYPE
1	3,37090030, C, A	ENSP00000231790	756	1	TTA C(C/A)C CTT	640	P	H	Single AA Change
		ENSP00000398272	515	1	TTA C(C/A)C CTT	399	P	H	Single AA Change
		ENSP00000402564	468	1	TTA C(C/A)C CTT	342	P	H	Single AA Change
		ENSP00000402647	515	1	TTA C(C/A)C CTT	399	P	H	Single AA Change
		ENSP00000443665	515	1	TTA C(C/A)C CTT	399	P	H	Single AA Change
		ENSP00000444286	460	1	TTA C(C/A)C CTT	399	P	H	Single AA Change

PROVEAN PREDICTION				SIFT PREDICTION			ANNOTATION		
SCORE	PREDICTION (cutoff=-2.5)	#SEQ	#CLUSTER	SCORE	PREDICTION (cutoff=0.05)	MEDIAN_INFO	#SEQ	dbSNP_ID	GENE_ID
-8.72	Deleterious	112	30	0.000	Damaging	2.86	78		ENSG00000076242
-8.42	Deleterious	107	30	0.000	Damaging	2.89	59		ENSG00000076242
-8.32	Deleterious	112	30	0.000	Damaging	2.84	61		ENSG00000076242
-8.42	Deleterious	107	30	0.000	Damaging	2.89	59		ENSG00000076242
-8.42	Deleterious	107	30	0.000	Damaging	2.89	59		ENSG00000076242
-8.12	Deleterious	112	30	0.000	Damaging	2.84	60		ENSG00000076242

Рисунок 32 – Анализ функциональной значимости герминальной мутации с.1919C>A в 17 экзоне гена *MLH1* с помощью программ SIFT и Provean.

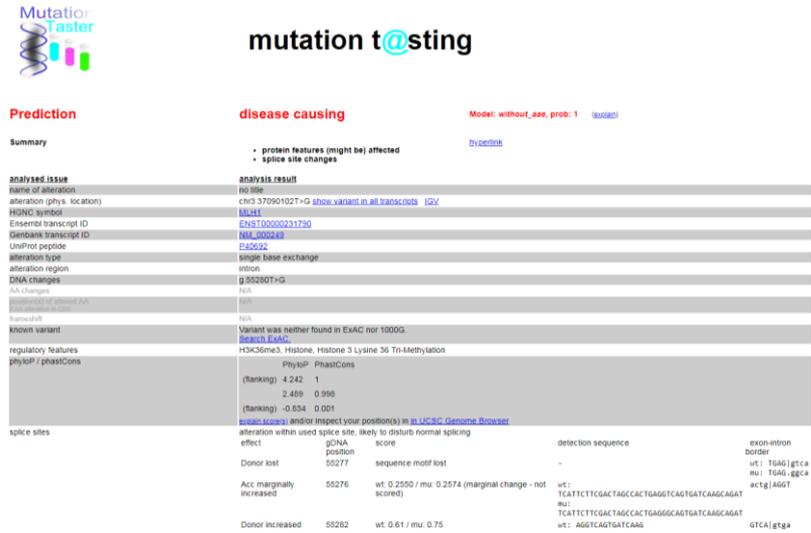


Рисунок 33 – Анализ функциональной значимости герминальной мутации c.1989+2T>G в 17 интроне гена *MLH1* с помощью программ Mutation Taster.

Оценка эффективности клинических критериев для формально-генетического диагноза синдром Линча

В нашем исследовании критерием включения пациентов для проведения молекулярно-генетической диагностики на предмет наличия герминальных мутаций в генах *MLH1* и *MSH2* являлось соответствие пересмотренным рекомендациям Бетезда, учитывая которые, синдром Линча был верифицирован для 30 больных (25,6%). Наиболее высокое значение точности показано для критериев «Амстердам I» (84%). При 90%-специфичности, являясь крайне «строгими», Амстердамские критерии I пересмотра не позволили отобрать для ДНК-диагностики 41% больных с СЛ, II пересмотра – 31%, соответственно. В таблице 36 представлены точность критериев «Амстердам I» и «Амстердам II» для выборки пациентов, включенных в данное исследование.

Таблица 36 - Точность критериев «Амстердам I» и «Амстердам II» для пациентов с формально-генетическим диагнозом СЛ, включенных в исследование.

	Чувствительность, %	Специфичность, %	Точность, %
«Амстердам I»	КАI ¹ +/СЛ+ 59	КАI-/СЛ- 90	85
«Амстердам II»	КАI ² +/СЛ+ 69	КАI-/СЛ- 75	75

Примечания: КАI – критерии «Амстердам I», КАII – критерии «Амстердам II»

Сравнительный клинико-морфологический анализ пациентов с синдромом Линча и сРТК.

Для выполнения сравнительного анализа клинико-морфологических данных больных с синдромом Линча и спорадическими формами неполипозного РТК сформирована контрольная группа больных (n=82), критериями включения в которую являлись: больные с гистологически верифицированным РТК с отсутствием микросателлитной нестабильности (MSS-статус) и/или наличием *BRAF*-мутации в образце опухоли в случае MSI-High, для двух больных с высоким уровнем MSI и *wtBRAF* дополнительно проведено *MLH1/MSH2*-генотипирование (возрастные и другие клинико-анамнестические данные не учитывались при отборе больных для включения в контрольную группу).

В таблице 37 представлены основные сравнительные клинико-морфологические характеристики нРТК (СЛ) и сРТК (группа контроля); на рисунке 34 - частота поражения отдельных участков толстой кишки в двух группах.

Таблица 37 - Клинико-морфологические характеристики нРТК (СЛ) и сРТК (группа контроля).

Признак		СЛ N=30		сРТК N=82	
		Частота	Процент	Частота	Процент
Возраст на момент манифестации РТК, л.		40,5±2* p<0.001	-	65,1±1	-
Пол	муж	14	46,6±9,1	35	42,7±5,5
	жен	16	53,4±9,1	47	57,3±5,5
Локализация	пр.	18	60,0±8,9* p=0.005	26	31,7±5,1
	лев.	11	36,7±8,8* p=0.005	55	67,1±5,2
	н/д	1	3,3±3,3	1	1,2±1,2
Гистологический вариант	АК	22	73,3±8,1	72	87,8±3,6
	МАК	3	10,0±5,5	7	8,5±3,1
	Медуллярный рак	1	3,3±3,3	-	-
	н/д	4	13,4±6,2	3	3,7±2,1
Степень дифференцировки	G1	3	10,0±5,5	7	8,5±3,1
	G2	12	40,0±8,9	49	59,8±5,4
	G3	7	23,3±7,2	14	17,1±4,2
	н/д	8	26,6±8,1	12	14,6±3,9

Стадия	I	2	6,6±4,5	11	13,5±3,8
	II	9	30,0±8,4	26	31,7±5,2
	III	12	40,0±8,9	23	28,0±5,0
	IV	2	6,6±4,5* p=0.028	21	25,6±4,8
	н/д	5	16,6±6,8	1	1,2±1,2
T	1	-	-	2	2,4±1,7
	2	4	13,4±6,2	12	14,7±3,9
	3	13	43,3±9,0	42	51,2±5,5
	4	10	33,3±8,6	25	30,5±5,1
	н/д	3	10,0±5,5	1	1,2±1,2
N	0	11	36,7±8,9	43	52,4±5,5
	1	8	26,6±8,1	22	26,8±4,9
	2	5	16,6±6,8	14	17,1±4,2
	н/д	6	20,0±7,3	3	3,7
M	0	23	76,6±7,7	60	73,2±4,9
	1	2	6,6±4,5* p=0.028	21	25,6±4,8
	н/д	5	16,6±6,8	1	1,2±1,2

Примечание: * - достоверно значимые различия признаков в группе больных с СЛ в сравнении с контрольной группой (сРТК).

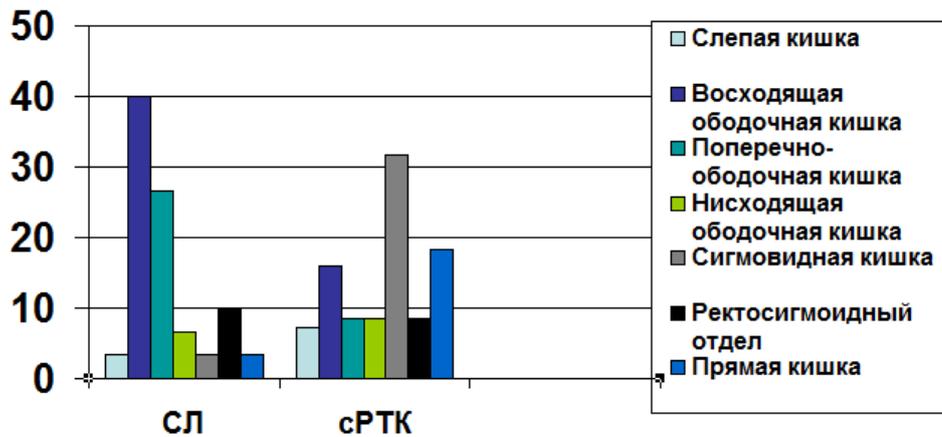


Рисунок 34 - Частотное поражение отдельных участков толстой кишки в группе больных с СЛ и контрольной группе (сРТК).

В нашем исследовании пациенты с синдромом Линча достоверно раньше заболевали РТК (40,5 лет vs 65,1 лет в контрольной группе ($p < 0.001$)). Самый ранний возраст манифестации РТК составил 18 лет, самый поздний - 64 года. В таблице 38 представлено частотное распределение больных с СЛ в зависимости от MMR-генотипа и возраста постановки диагноза РТК.

Таблица 38 - Частотное распределение больных с СЛ в зависимости от MMR-генотипа и возраста постановки диагноза РТК.

	≤20 лет	21-40 лет	≥41 лет
<i>mutMLH1</i> (N=17)	5,8% (n=1)	64,7% (n=11)	29,4% (n=5)
<i>mutMSH2</i> (N=13)	-	30,8% (n=4)	69,2% (n=9)

СЛ с сопоставимой частотой диагностировался у мужчин и женщин (46,6% и 53,4%, соответственно). Линч-ассоциированные опухоли достоверно чаще локализовались в правых отделах толстой кишки ($p=0.005$) и были представлены морфологически аденокарциномами кишечного типа различной степени дифференцировки. РТК в составе СЛ достоверно реже диагностировался на IV стадии заболевания (6,6% vs 25,6% в группе сРТК, $p=0.028$).

Статус микросателлитной нестабильности в образцах опухолевой ткани оценен у 28 больных с СЛ (таблица 39). Двум пациентам данное исследование не выполнено в связи с отсутствием биологического материала. Наличие более одного нестабильного маркера (MSI-High) в образцах колоректального рака выявлено во всех исследованных случаях у 23 больных с СЛ, в т.ч. в метакронных опухолях толстой кишки. У шести больных нестабильный MMR-фенотип определен в образцах опухолей других линч-ассоциированных локализаций (РЯ, РТМ, рак мочевого пузыря, рак тонкой кишки), в то время как отсутствие MSI (MSS) характеризовало новообразования вероятно спорадической природы у пациентов с СЛ (рак предстательной железы, рак молочной железы).

Таблица 39 - Статус микросателлитной нестабильности в образцах опухолей различной локализации у больных с СЛ.

Пациент	Пол	Злокачественное новообразование	MSI-статус
1.	ж ¹	РТК	MSI-High
		РЯ ³	MSI-High
2.	ж	РТК	MSI-High
3.	ж	РТК	MSI-High
4.	ж	РТК	MSI-High

5.	м ²	РТК	MSI-High
6.	ж	---	---
7.	м	РТК	MSI-High
		РТК	MSI-High
8.	м	РТК	MSI-High
9.	ж	РТК	MSI-High
10.	м	РТК	MSI-High
		РТК	MSI-High
11.	м	РТК	MSI-High
12.	ж	РТК	MSI-High
13.	м	РТК	MSI-High
14.	м	РТК	MSI-High
15.	ж	PTM ⁴	MSI-High
16.	ж	---	---
17.	ж	РТК	MSI-High
18.	ж	РТК	MSI-High
19.	м	РТК	MSI-High
20.	ж	РТК	MSI-High
21.	м	РПредЖ ⁵	MSS
		РМочет ⁶	MSI-High
22.	ж	PTM	MSI-High
23.	м	РТК	MSI-High
24.	м	РТК	MSI-High
25.	м	РТК	MSI-High
26.	м	РТКК ⁷	MSI-High
		РМочП ⁸	MSI-High
27.	ж	РМЖ	MSS
28.	м	РТК	MSI-High
		РТКК	MSI-High
29.	ж	РТК	MSI-High
30.	ж	РТК	MSI-High

Примечания: женский пол; мужской пол; рак яичников; рак тела матки; рак предстательной железы; рак мочеочника; рак тонкой кишки; рак мочевого пузыря.

На рисунке 35 представлены электрофореграммы маркеров NR27, NR21, NR24, BAT 25 и BAT 26 в образцах опухолей толстой кишки и мочевого пузыря пациента с СЛ. В обоих случаях регистрируется высокий уровень

микросателлитной нестабильности, учитывая единую патогенетическую природу заболеваний. Однако, высокая органная специфичность представленной диагностической панели определяет дискондантность длин анализируемых фрагментов при данных нозологиях.

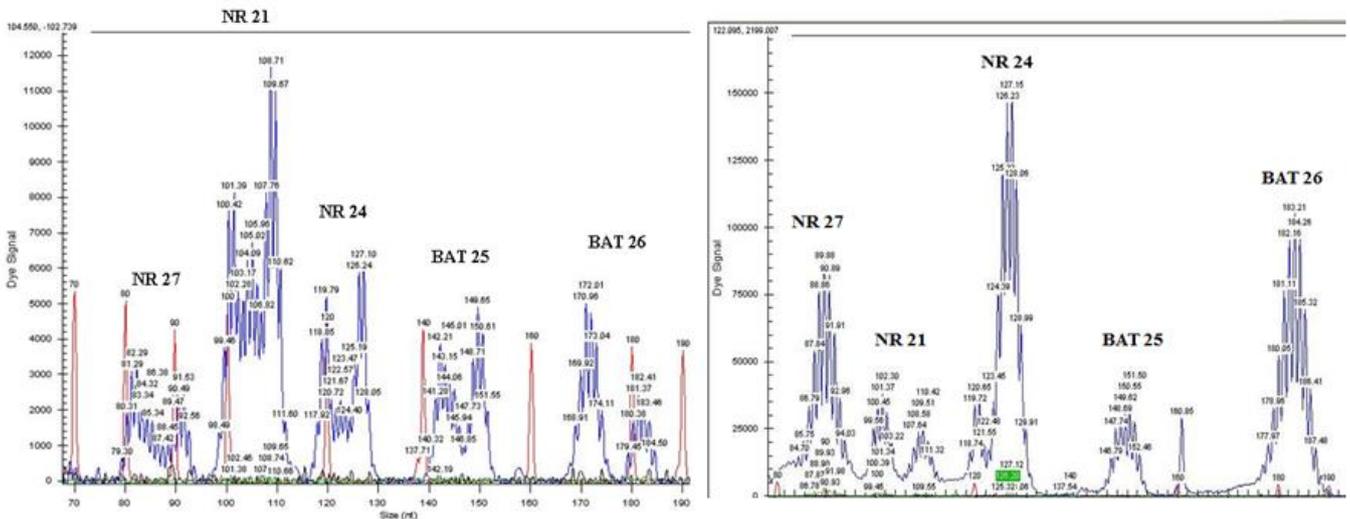


Рисунок 35 - Электрофореграммы маркеров NR27, NR21, NR24, БАТ 25 и БАТ 26 в образцах опухолей толстой кишки и мочевого пузыря пациента с СЛ.

BRAF-статус определен в образцах РТК у 23 больных с СЛ. Отсутствие соматических мутаций подтверждено у всех пациентов с патологическим *MLH1/MSH2*-генотипом.

Отягощенный онкологический семейный анамнез выявлен у 28 больных с СЛ (93,3%). Отсутствие онкологической нагруженности отмечено у одного пациента с патологическим *MLH1*-генотипом и у одного больного с герминальной мутацией в гене *MSH2*. При анализе родословных:

- наличие родственников ПСР с ЗНО выявлено у 96,4% больных (n=27), из них у 55,5% (n=15) диагностирован РТК в возрасте до 50 лет;
- наличие родственников ВСР с ЗНО выявлено у 85,7% больных (n=24);
- наличие родственников ТСР с ЗНО выявлено у 32,1% больных (n=9);
- число пораженных поколений в среднем составило 2,7 (2-4 поколения);
- число родственников с ЗНО в родословной – 4,1 (1-12 родственников);
- число родственников ПСР с ЗНО в родословной – 1,6 (0-5 родственников);

- число родственников ВСР с ЗНО в родословной – 2,4 (0-5 родственников);
- число родственников ТСР с ЗНО в родословной – 1,4 (0-2 родственника).

Примеры родословных больных с *MLH1* и *MSH2*-ассоциированными РТК в составе СЛ представлены на рисунке 36.

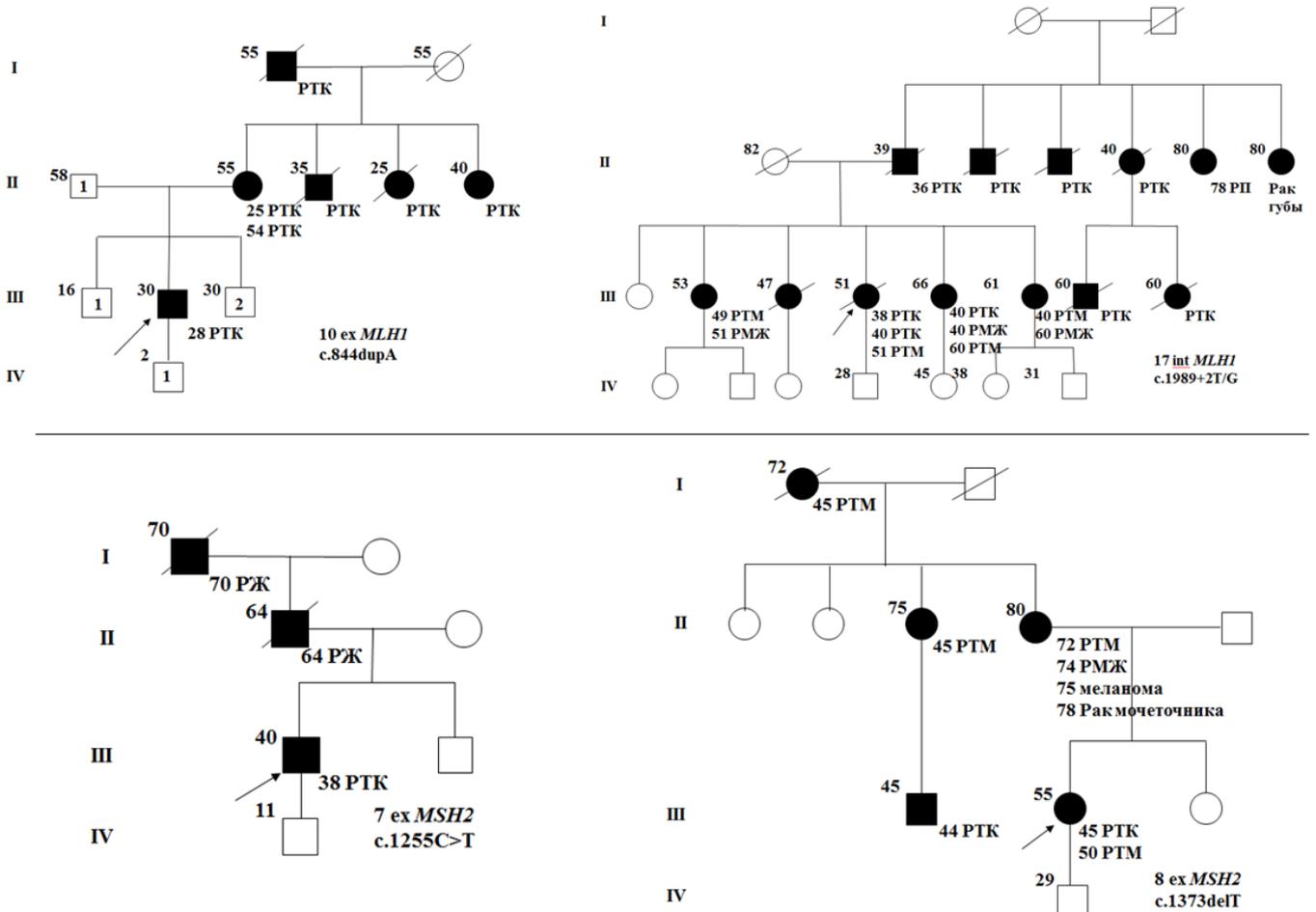


Рисунок 36 - Примеры родословных больных с *MLH1* и *MSH2*-ассоциированными РТК в составе СЛ.

В семейном анамнезе пациентов с СЛ самым частым ЗНО был РТК, отмеченный достоверно чаще в группе *MLH1*-ассоциированного РТК (54,9% vs 23,3%, $p=0.012$). Статистически значимого различия достигла более высокая частота рака желудка в семейном анамнезе у пациентов с *MSH2*-ассоциированным СЛ (30% vs 5,8%, $p=0.009$), где патология желудка вышла на первое место в структуре семейного онкологического анамнеза. Другой лидирующей по частоте опухолью был РТМ, статистической значимости, выявленная частотная разница в подгруппах, не достигнуто ($p=0.236$). Частота встречаемости различных ЗНО в

родословных больных с СЛ в зависимости от генотипа представлена на рисунке 37.

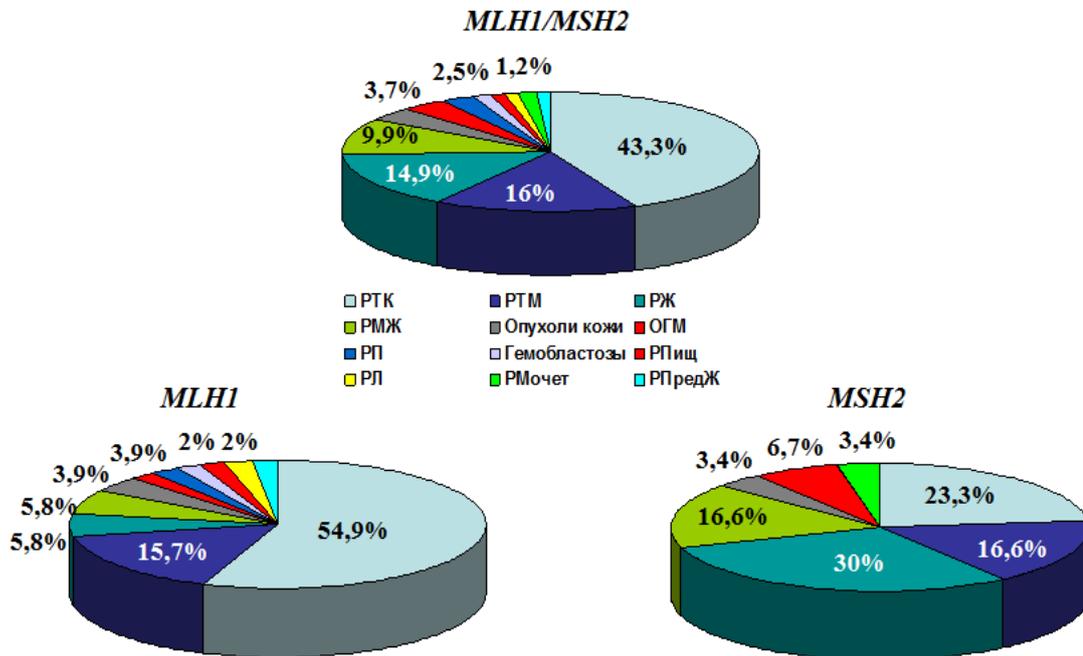


Рисунок 37 - Частота встречаемости различных ЗНО в родословных больных с СЛ в зависимости от *MLH1/MSH2*-генотипа (РТМ – рак тела матки; РЖ – рак желудка; РМЖ – рак молочной железы; ОГМ – опухоль головного мозга; РП – рак почки; РПищ – рак пищевода; РЛ – рак легких; РМочет – рак мочеочечника; РПредЖ – рак предстательной железы).

У 15 пациентов (50,0%) РТК был диагностирован в составе Линч-ассоциированных ПМЗН. В среднем у каждого пациента было выявлено 3 ЗНО (от 2 до 7 первичных опухолей). Временной интервал до манифестации каждого последующего ЗНО составил 2,9 лет (при метахронном ЗНО максимальный временной промежуток составил 25 лет). Самыми частыми вторыми первичными опухолями были синхронный или метахронный РТК, выявленный в 26,3% случаев, рак тонкой кишки - в 11,9%, РТМ - в 11,9% и РМЖ – в 11,9% случаев, соответственно. При сравнительном анализе подгрупп ПМЗН в зависимости от генотипа синхронный или метахронный РТК достоверно чаще встречался у пациентов-носителей *MLH1*-патологического генотипа ($p=0.017$), других

достоверных различий по частоте встречаемости ЗНО, в т.ч. рака тела матки и рака тонкой кишки для *MLH1*- и *MSH2*-ассоциированного СЛ выявлено не было. В целом, пациенты-носители герминальных мутаций в гене *MSH2* характеризовались более широким спектром ЗНО в сравнении с больными с *MLH1*-мутациями, где в структуре вторых и последующих опухолей доминировали РТК, а также РТМ и РМЖ у женщин. Опухоли мочевыделительной системы отмечены только у больных с герминальными *MSH2*-мутациями. На рисунке 38 представлена структура вторых первичных опухолей у пациентов с СЛ в общей группе и в зависимости от генотипа.

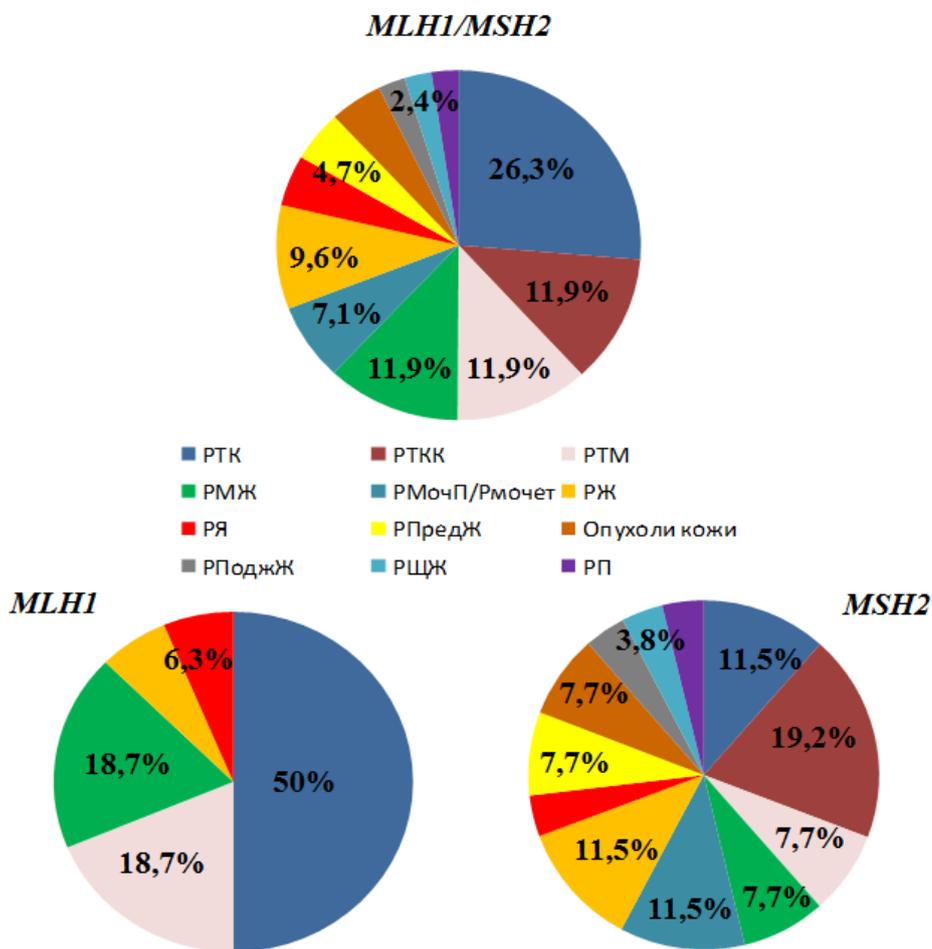


Рисунок 38 - Структура вторых первичных опухолей у пациентов с СЛ в общей группе и в зависимости от *MLH1/MSH2*-генотипа (РТКК – рак тонкой кишки; РТМ – рак тела матки; РМЖ – рак молочной железы; РМочП – рак мочевого пузыря; РМочет – рак мочеточника; РЖ – рак желудка; РЯ – рак яичников; РПредЖ – рак предстательной железы; РПоджЖ – рак поджелудочной

железы; РЩЖ – рак щитовидной железы; РП – рак почки).

В 31,3% (5/16) случаев у женщин СЛ манифестировал не с РТК. Среди мужчин – у двух больных РТК (14% (2/14)) не был первым проявлением заболевания, при этом в обоих случаях пациенты были носителями герминальных мутаций в гене *MSH2*. В таблице 40 представлена структура первых, вторых и последующих ЗНО у больных с СЛ в зависимости от пола.

Таблица 40 - Структура первых, вторых и последующих ЗНО у больных с СЛ в зависимости от пола.

Структура первых ЗНО у больных с СЛ			
Мужчины, число случаев		Женщины, число случаев	
РТК	12	РТК	11
РЖ	1	РЯ	2
РТКК	1	РМЖ	2
		РТМ	1
Структура вторых и последующих ЗНО у больных с СЛ			
Мужчины, число случаев		Женщины, число случаев	
РТК	8	РТК	8
РТКК	3	РТМ	4
Рак мочет/РМочП	3	РМЖ	3
РПрЖ	2	РЖ	2
Опухоли кожи	2	РТКК	1
РПодЖ	1	РЩЖ	1
РЖ	1	РП	1

3.2.2. Оценка выживаемости больных с синдромом Линча

В нашем исследовании у 2 больных с СЛ РТК диагностирован на IV стадии и у двух пациентов отмечено прогрессирование заболевания после окончания лечения. Во всех случаях больные являлись носителями герминальных мутаций в гене *MLH1*. У одного пациента с патологическим *MSH2*-генотипом отмечено прогрессирование РЖ. Летальный исход отмечен у четырех больных: в трех

случаях от прогрессирования РТК и у одной больной от сопутствующей патологии (ишемическая болезнь сердца). На рисунках 39 и 40 представлены графики общей выживаемости (ОВ) больных с СЛ, а также опухоль-специфической выживаемости пациентов с РТК в составе СЛ в зависимости от *MLH1/MSH2* генотипа. Достоверных различий в показателях выживаемости выявлено не было. Медиана наблюдения достигнута только в группе больных *MLH1*-ассоциированным РТК (158 мес.) (таблицы 41 и 42).

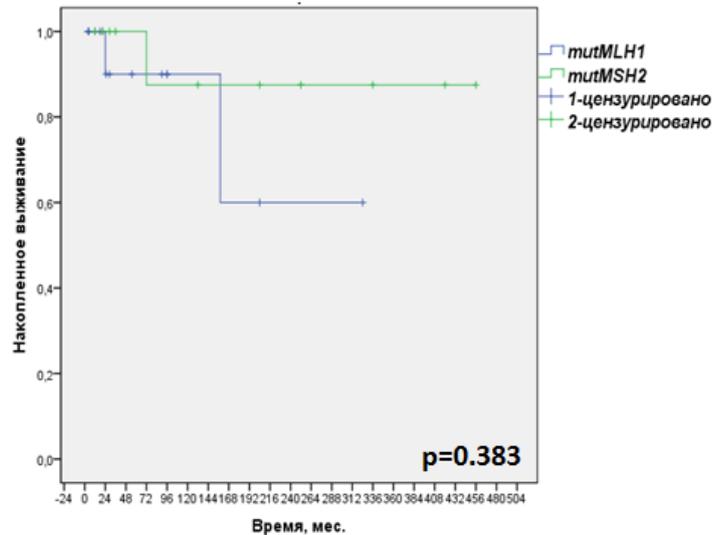


Рисунок 39 - Общая выживаемость больных с СЛ в зависимости от *MLH1/MSH2*-генотипа.

Таблица 41 - 5-, 10- и 15-летняя общая выживаемость, а также медиана выживаемости больных с СЛ в зависимости от *MLH1/MSH2*-генотипа.

N=28	5 лет	10 лет	15 лет	Медиана
<i>MutMLH1</i>	90,0%	90,0%	60,0%	Не достигнута
<i>MutMSH2</i>	100%	87,5%	87,5%	Не достигнута

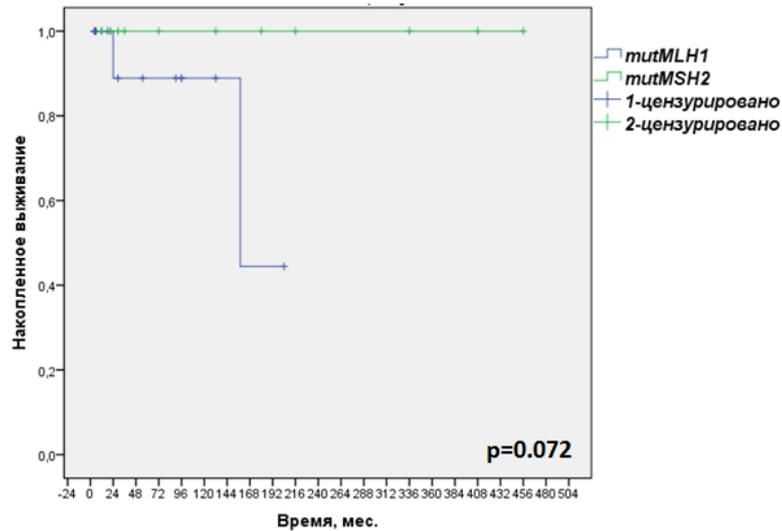


Рисунок 40 - Опухоль-специфическая выживаемость больных РТК в составе СЛ в зависимости от *MLH1/MSH2*-генотипа.

Таблица 42 - 5-, 10- и 15-летняя опухоль-специфическая выживаемость больных РТК в составе СЛ в зависимости от *MLH1/MSH2*-генотипа.

N=27	5 лет	10 лет	15 лет	Медиана
<i>MutMLH1</i>	88,9%	88,9%	44,4%	158 мес.
<i>MutMSH2</i>	100%	100%	100%	Не достигнута

На рисунках 41 и 42 представлены графики выживаемости больных в зависимости от вида мутаций в генах *MLH1* и *MSH2*. Для данного анализа все больные стратифицированы в две группы: 1) с мутациями сайта сплайсинга/миссенс-вариантами и 2) с мутациями, влияющими на рамку считывания/нонсенс-вариантами. Достоверных различий между исследуемыми группами получено не было (таблицы 43 и 44).

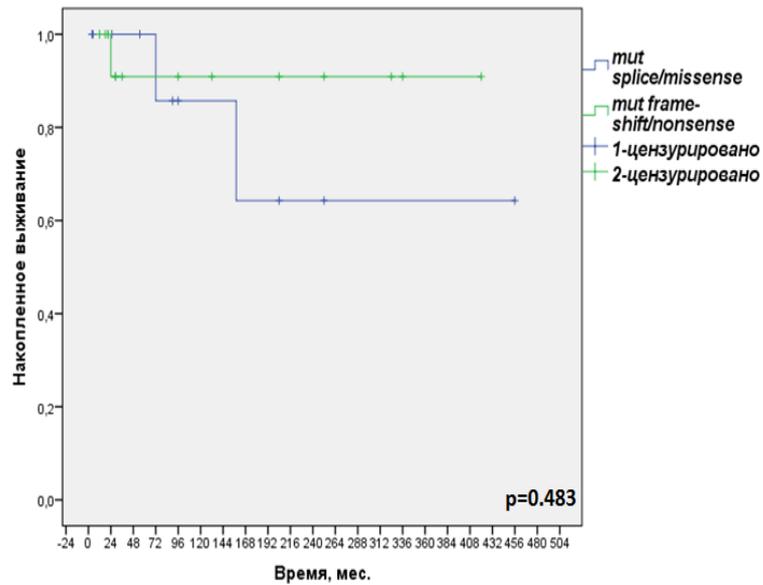


Рисунок 41 - Общая выживаемость больных с СЛ в зависимости от вида герминальных мутаций в генах *MLH1/MSH2*-генотипа.

Таблица 43 - 5-, 10- и 15-летняя общая выживаемость больных с СЛ в зависимости от вида герминальных мутаций в генах *MLH1/MSH2*-генотипа.

N=28	5 лет	10 лет	15 лет	Медиана
<i>Mut splice/missense</i>	100%	85,7%	64,3%	Не достигнута
<i>Mut frame-shift/nonsense</i>	90,9%	90,9%	90,9%	Не достигнута

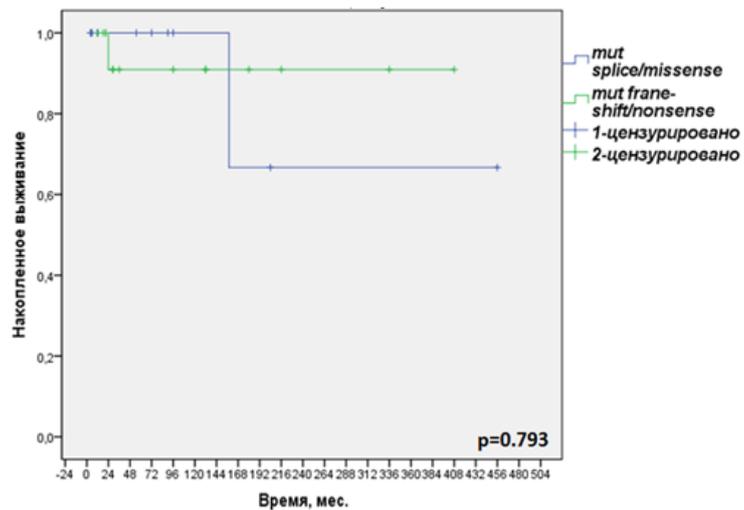


Рисунок 42 - Опухоль-специфическая выживаемость больных РТК в составе СЛ в зависимости от вида герминальных мутаций в генах *MLH1/MSH2*-генотипа.

Таблица 44 - 5-, 10- и 15-летняя опухоль-специфическая выживаемость больных РТК в составе СЛ в зависимости от вида герминальных мутаций в генах *MLH1/MSH2*-генотипа.

N=27	5 лет	10 лет	15 лет	Медиана
Mut splice/missense	100%	100%	66,7%	Не достигнута
Mut frame-shift/nonsense	90,9%	90,9%	90,9%	Не достигнута

3.2.3. ДНК-генотипирование герминальных мутаций в гене *APC*

В нашем исследовании молекулярно-генетическая диагностика на предмет наличия герминальных мутаций в гене *APC* выполнена 26 пациентам с полипозным поражением толстой кишки (≥ 20 полипов). Для 23 пациентов ДНК-диагностика проводилась стандартными методами (HRM или CSGE) с последующим капиллярным секвенированием. Таргетное секвенирование с применением разработанной диагностической панели генов, участвующих в канцерогенезе ЗНО ЖКТ, выполнено 3 больным. Герминальные патогенные клинически значимые мутации были выявлены у 16 пациентов (61,5%). Перечень выявленных мутаций представлен в таблице 45.

Таблица 45 - Герминальные мутации в гене *APC*, диагностированные у больных САП.

Protein	Coding	Экзон/ интрон	rs (dbSNP)
Arg216Ter	646C>T	6 экзон	rs62619935
Arg217Asnfs*34	649_650delAG	6 экзон	-
Tyr191Asnfs*15	569_570insGA	6 экзон	rs876658176
-	c.1311_1312+10delAAGTATGTTCTC	9 экзон- 9 интрон	-
Leu508Phefs*27	1524_1528delGACTT	10 экзон	-
Gln541Ter ¹	1621C>T	12 экзон	rs137854574
-	1959-1G>A	14 интрон	rs863225321
Thr628Ilefs*2	1883delC	14 экзон	-
Tyr796Metfs*24	2386delT	15 экзон	-
Asp849Glufs*11	2547_2552delTAGA	15 экзон	rs398123118

Ser1068Glyfs*57	3202_3205delTCAA	15 экзон	rs587779353
Glu1150Aspfs*14	3450_3453delAAGA	15 экзон	-
Glu1309Aspfs*4 ¹	3927_3931delAAAGA	15 экзон	rs121913224
Ser1465Trpfs*3	4393_4394delAG	15 экзон	rs387906234

Примечание. 1 – мутация, выявленная у двух больных.

В 42,8% случаев (6/14) выявленные мутации локализовались в 15 экзоне гена *APC*. Одна нонсенс-мутация в 12 экзоне и делеция 5 нуклеотидов в кодоне 1309 диагностированы дважды. В структуре мутаций на долю вариантов со сдвигом рамки считывания пришлось 71,4% диагностированных мутаций (10/14), в двух случаях выявлены нонсенс-мутации (14,3%), варианты, вовлекающие сайты-сплайсинга 9 и 14 экзонов детектированы у двух больного (14,3%). Восемь из 14 мутаций зарегистрированы в международных базах данных dbSNP, Ensembl.genome, dbSNP и LOVD как патогенные клинически значимые варианты. Для мутаций, не зарегистрированных ранее, функциональная значимость определялась с помощью программ Human Splicing Finder и MutationTaster (рисунок 43).

Mutation Taster documentation

mutation t@sting

Prediction disease causing Model: complex_ase, prob: 1 (classification due to NMD, real probability is shown anyway) (scale)

Summary

- NMD
- amino acid sequence changed
- frameshift
- protein features (might be) affected
- splice site changes

analysed issue analysis result

name of alteration	no fee
alteration (phys. location)	chr8:112170787_112170787delC
HGNC symbol	APC
Ensembl transcript ID	ENST00000457016
Genbank transcript ID	NM_001122510
UniProt peptide	P22054
alteration type	deletion
alteration region	CDS
DNA changes	c.1883_1883delC cDNA:2263_2263delC g.127693_127693delC
AA changes	T628in*2
position(s) of altered AA	628 (frameshift or PTC - further changes downstream)
#AA altered in CDS	1
frameshift	yes
known variant	Variant was neither found in ExAC nor 1000G Search ExAC
regulatory features	H3K36me3, Histone, Histone 3 Lysine 36 Tri-Methylation H3K27me1, Histone, Histone 3 Lysine 27 mono-methylation
phyloP / phastCons	PhyloP PhastCons

Рисунок 43 – Анализ функциональной значимости герминальной мутации с. 1883delC в 14 экзоне гена *APC* с помощью программ Mutation Taster.

На рисунке 44 представлены фрагменты сиквенса гена *APC* с выявленной патогенной мутацией.

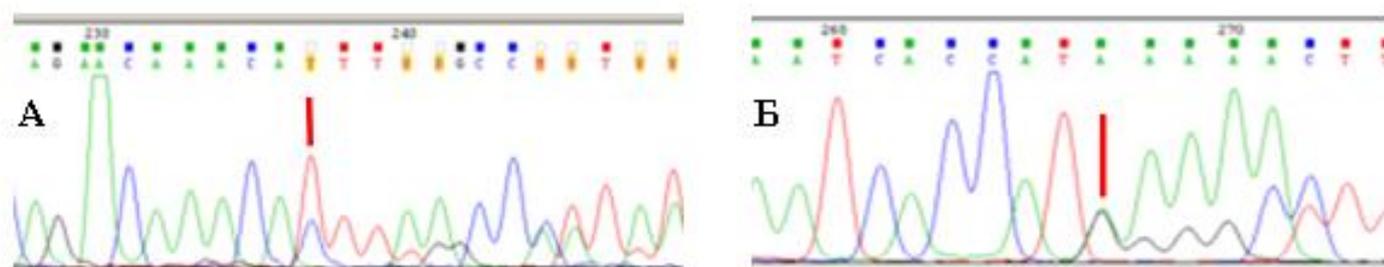


Рисунок 44 - Фрагменты сиквенса гена *APC* с выявленной патогенной мутацией (А-14 экон с.1883delC; Б – 15 экон с.2386delT).

Основные клинические и морфологические данные пациентов с САП представлены в таблице 46.

Таблица 46 - Основные клинические и морфологические данные пациентов с САП.

Признак		САП (N=13)	
		Частота	Процент
Возраст на момент манифестации РТК, л.		41,6±3,9* (p<0.001)	-
Пол	муж	8	50,0±12,9
	жен	8	50,0±12,9
Локализация	пр.	2	12,5±8,5
	лев.	12	75,0±11,2
	н/д	2	12,5±8,5
Гистологический вариант	АК	13	81,3±10,1
	н/д	3	18,7±10,1
Степень дифференцировки	G1	2	12,5±8,5
	G2	6	37,5±12,5
	G3	-	-
	н/д	8	50,0±12,9
Стадия	I	3	18,7±10,1
	II	3	18,7±10,1
	III	4	25,0±11,2
	IV	5	31,3±12,0
	н/д	1	6,3±6,3
T	1	1	6,3±6,3
	2	2	12,5±8,5
	3	6	37,5±12,5
	4	5	31,3±12,0
	н/д	2	12,4±8,5

N	0	6	37,5±12,5
	1	1	6,3±6,3
	2	6	37,5±12,5
	н/д	3	18,7±10,1
M	0	10	62,5±12,5
	1	5	31,3±12,0
	н/д	1	6,3±6,3

Средний возраст манифестации РТК составил 41,6 лет, что статистически значимо отличается от группы сРТК ($p < 0.001$). В 75% случаев ($n=12$) опухоли локализовались в левой половине толстой кишки (рисунок 45), гистологически были представлены умереннодифференцированной аденокарциномой (81,3%, $n=13$). У 31,3% пациентов заболевание диагностировано на IV стадии.



Рисунок 45 - Локализация РТК у больных с САП.

У 87,5% больных (14/16) выявлено наличие более 100 полипов толстой кишки, морфологически классифицированные как villous, tubular and tubulovillous adenomas различной степени дисплазии – диагностирован классический вариант САП. У двух больных с мутациями в 6 экзоне гена *APC* и поздним возрастом манифестации РТК (50 лет и 54 года) диагностировано менее 100 полипов.

У трех пациентов с САП отмечены другие проявления данного синдрома: у больного с мутацией в 14 экзоне гена *APC* выявлена остеома верхней челюсти, у больной с герминальным дефектом в 15 экзоне выявлено распространенное

фиброматозное поражение передней грудной стенки (РТК в составе синдрома Гарднера) и у пациентки с герминальной мутацией в 12 экзоне – папиллярный рак щитовидной железы. У 5 больных (31,3%) диагностированы первично-множественные опухоли толстой кишки: в трех случаях зарегистрированы синхронные ЗНО и в двух случаях метакронный рак с интервалом до манифестации второй первичной опухоли один год и три года, соответственно. На рисунке 46 представлена диаграмма корреляции между расположением мутации в гене *APC* и клиническими проявлениями САП.

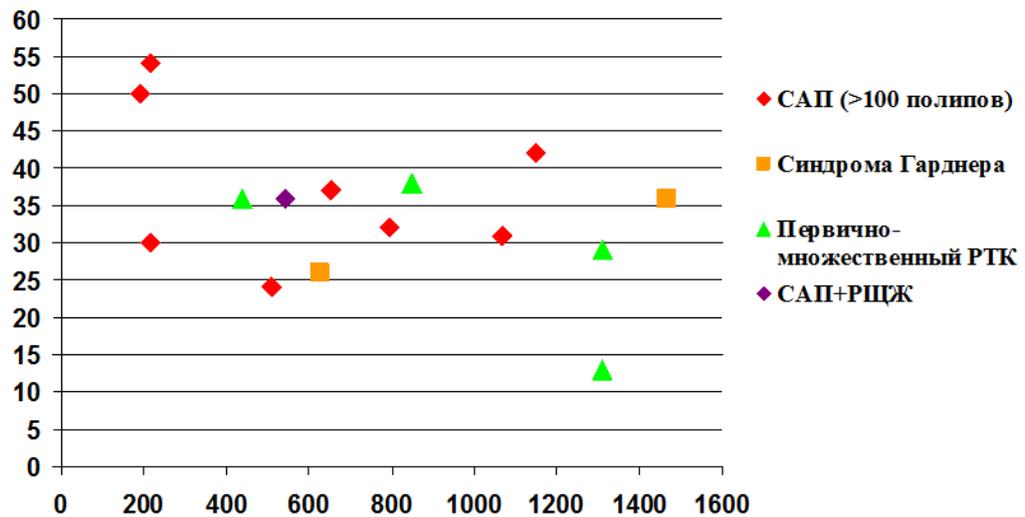


Рисунок 46 - Диаграмма корреляции между расположением мутации в гене *APC* и клиническими проявлениями САП (ось абсцисс соответствует кодону гена *APC*, ось ординат – возрасту на момент манифестации РТК).

Соматический статус гена *KRAS* определен у 6 пациентов с патологическим *APC*-генотипом. Соматические мутации выявлены во всех исследованных образцах.

Отягощенный онкологический семейный анамнез выявлен у 75% (12/16) больных. У четверых пациентов в семейной истории не отмечено ни одного случая онкологического заболевания. При анализе родословных:

- наличие родственников ПСР с ЗНО выявлено у 83,3% больных (n=10), среди них РТК встречался в 70% случаев (n=7);
- наличие родственников ВСР с ЗНО выявлено у 91,7% больных (n=11);
- наличие родственников ТСР с ЗНО выявлено у 25% больных (n=3);

- число пораженных поколений в среднем составило 2,6 (2-4 поколения);
- число родственников с ЗНО в родословной – 3,1 (1-9 родственников);
- число родственников ПСР с ЗНО в родословной – 1,2 (0-2 родственника);
- число родственников ВСР с ЗНО в родословной – 2 (0-4 родственника);
- число родственников ТСР с ЗНО в родословной – 1,8 (0-3 родственника).

Самым частым злокачественным новообразованием в родословных был РТК, который отмечен в семейной истории у 9 из 12 пациентов (75%). Вторым по частоте был РЖ (41,6%, n=5). Реже встречались другие локализации: РЛ (16,6%, n=2), РТМ (8,3%, n=1), рак поджелудочной железы (8,3%, n=1), гемобластозы (8,3%, n=1), рак пищевода (8,3%, n=1) и остеосаркома (8,3%, n=1). Пример родословной пациентов с *APC*-ассоциированными РТК в составе САП представлен на рисунке 47.

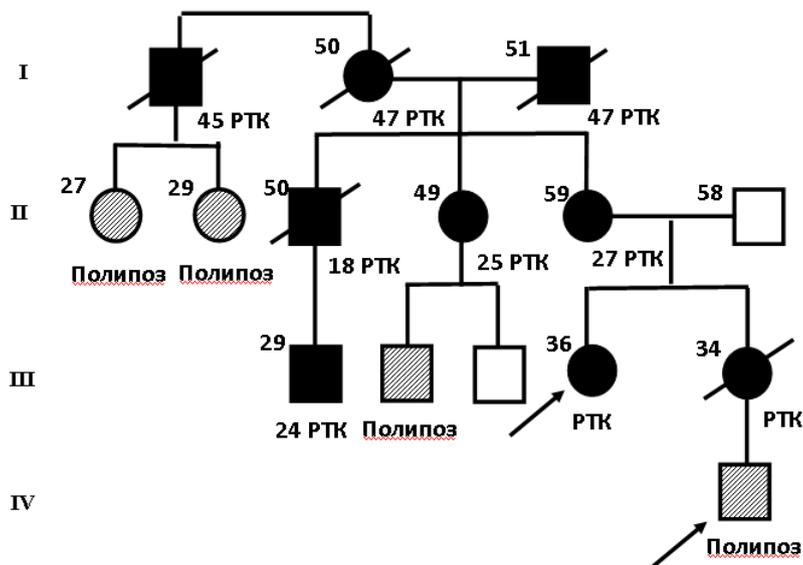


Рисунок 47 - Родословная пациента с *APC*-ассоциированными РТК в составе САП.

3.2.4. ДНК-диагностика герминальных мутаций в генах, вовлеченных в канцерогенез ЗНО ЖКТ, с применением метода NGS

В нашем исследовании для 21 пациента: 18 больным с формально-генетическим диагнозом СЛ и 3 пациентам с САП, выполнено ДНК-тестирование с применением разработанной таргетной диагностической панели генов,

участвующих в канцерогенезе различных ЗНО ЖКТ, на платформе для таргетного секвенирования 454 Sequencing GS Junior (Roche Diagnostics, Швейцария) с использованием олигонуклеотидных зондов NimbleGen Sequence Capture. Все этапы пробоподготовки, создания библиотек, проведения эмульсионной ПЦР и пиросеквенирования были выполнены согласно протоколам производителя. Производительность GS Junior составила > 35 миллионов нуклеотидов за один запуск, время запуска - 10 ч. – секвенирование + 2 ч. – первичная обработка данных, средняя длина прочтений составила - 400 нуклеотидов при точности 99% для 400 нуклеотидов.

Перечень генов-кандидатов, включенных в диагностическую панель, приведен в таблице 47. Референсные последовательности (все кодирующие экзоны+сайты сплайсинга) соответствовали GRCh37.p13.

Таблица 47 - Гены-кандидаты, включенные в диагностическую панель для NGS.

№	Хромосома	Ген	Ассоциированный синдром
1	1	<i>MUTYH</i>	<i>MUTYH</i> -ассоциированный полипоз
2	2	<i>EPCAM</i>	СЛ
3	2	<i>MSH6</i>	СЛ
4	2	<i>MSH2</i>	СЛ
5	2	<i>PMS1</i>	СЛ
6	3	<i>MLH1</i>	СЛ
7	5	<i>APC</i>	САП, АСАП
8	7	<i>PMS2</i>	СЛ
9	10	<i>BMPR1A</i>	Синдром ювенильного полипоза
10	10	<i>PTEN</i>	Гамартомные синдромы
11	16	<i>CDH1</i>	Наследственный диффузный рак желудка
12	17	<i>TP53</i>	Синдром Ли-Фраумени
13	18	<i>SMAD4</i>	Синдром ювенильного полипоза
14	19	<i>STK11</i>	Синдром Пейтца-Йегерса
15	22	<i>CHEK2</i>	Ли-Фраумени-подобный синдром

В нашем исследовании один запуск прибора позволял выполнить таргетное секвенирование 12 пациентам. На рисунке 48 приведены выходные данные одного

из запусков: производительность составила 69 256 727 п.н., средняя длина прочтений – 454,62 п.н.

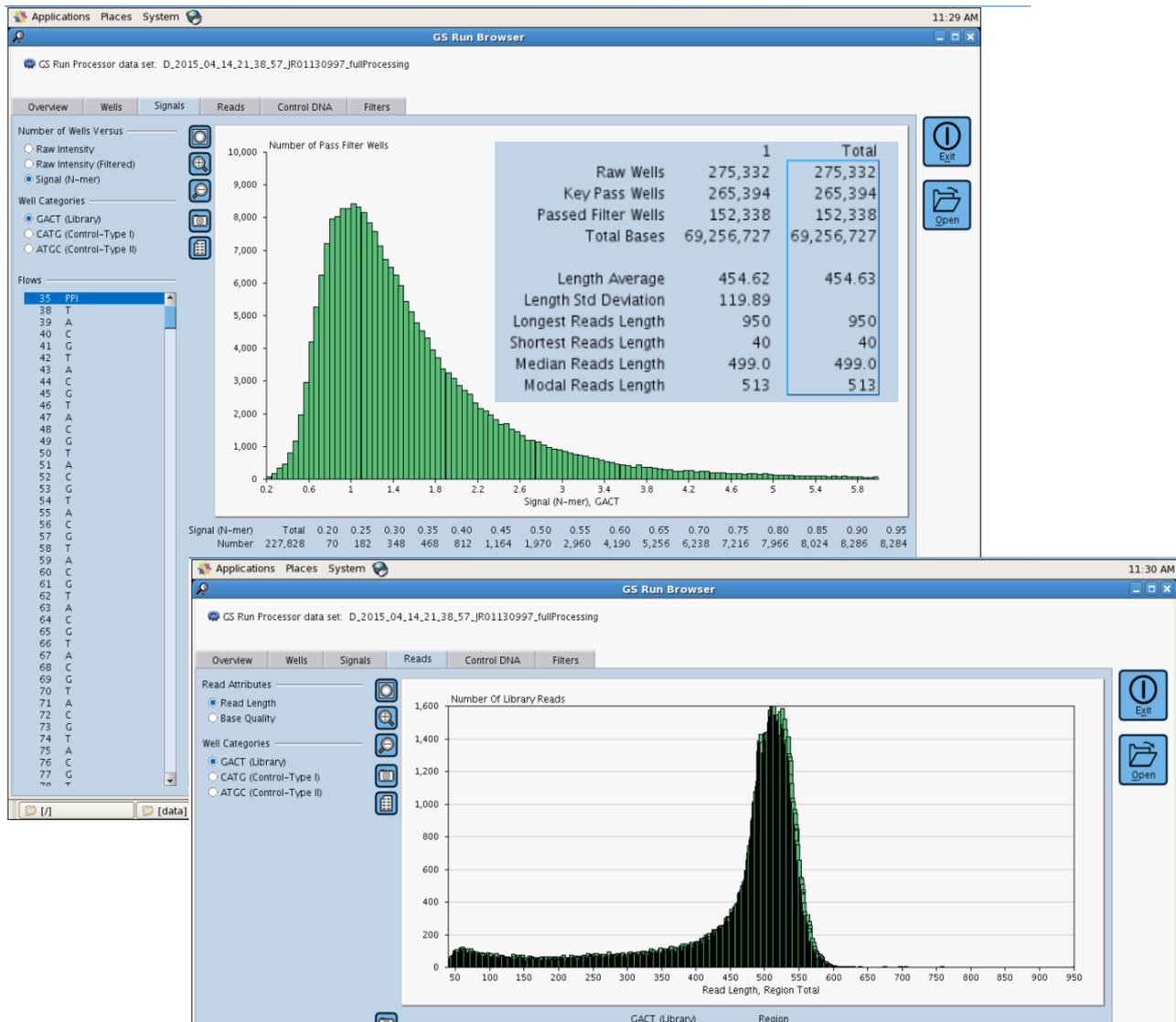


Рисунок 48 - Выходные данные одного из запусков: производительность составила 69 256 727 п.н., средняя длина прочтений – 454,62 п.н.

В среднем число выявленных вариантов генов на одного пациента составило 116,7 (71-179) со средним покрытием - 22 (11-29) прочтения; из них среднее число экзонных вариантов - 18,3 (13-40) со средним покрытием 38,4 (18-54). Интерпретация результатов таргетного секвенирования осуществлялась согласно стандартам и рекомендациям Американской школы медицинской генетики и геномики ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics, США) и Ассоциации молекулярных патологов AMP (Association for Molecular Pathology,

США) [242]. Все выявленные варианты были стратифицированы на доброкачественные (benign, класс 1), варианты с неизвестным клиническим значением (likely benign, VUS, likely pathogenic, классы 2, 3 и 4, соответственно) и патогенные (pathogenic), опорным показателем значимости являлось отнесение варианта в ту или иную категорию согласно международным базам данных dbSNP, InSIGHT, EnsemblGenome, HGMD.

У 9 пациентов в нашем исследовании выявлены патогенные клинически значимые мутации (43%): у 3 больных в гене *APC*, у 3 пациентов в гене *MLH1* и у 3 больных в гене *MSH2*. Патогенный миссенс-вариант p.I157T в гене *CHEK2* определен у одной больной САП наряду с нонсенс-мутацией в гене *APC*. Все выявленные патогенные мутации подтверждены секвенированием по Сэнгеру (рисунки 49-51).

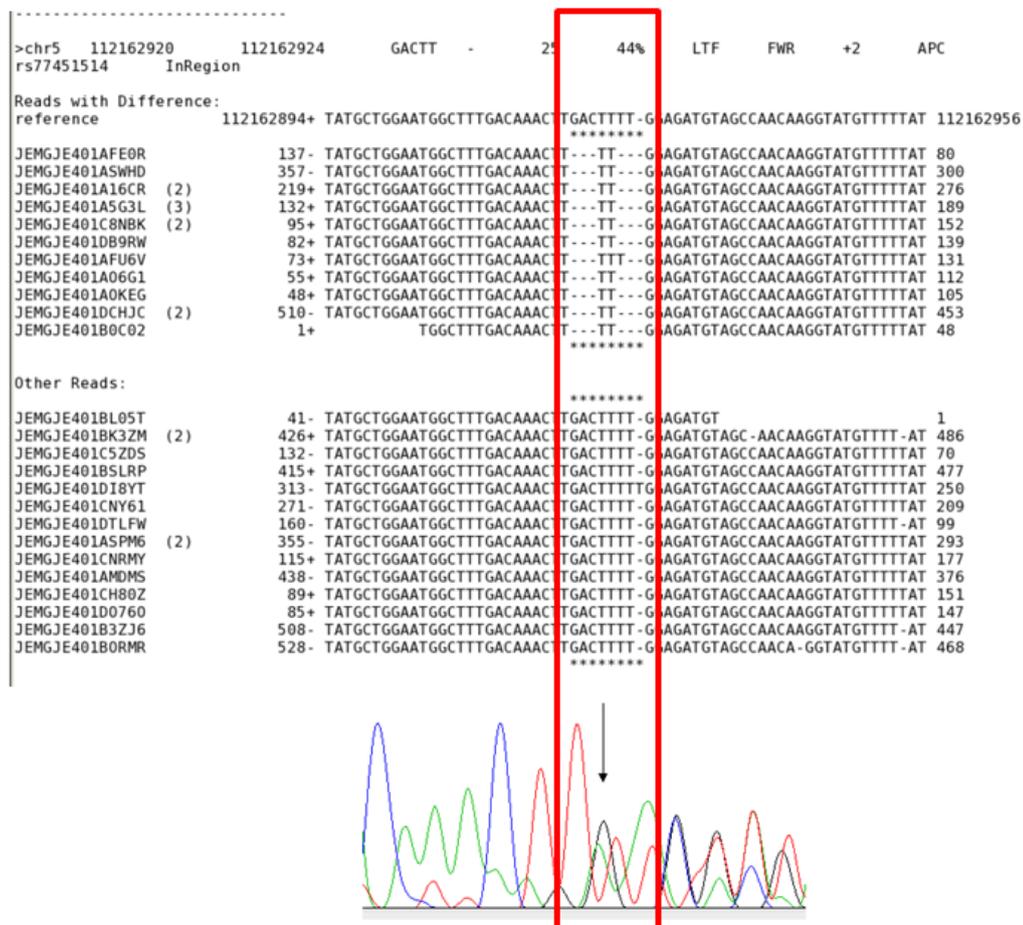


Рисунок 49 - Герминальная мутация с.1524_1528delGACTT в 9 экзоне гена *APC* в гетерозиготном состоянии, диагностированная с помощью NGS и подтвержденная секвенированием по Сэнгеру.

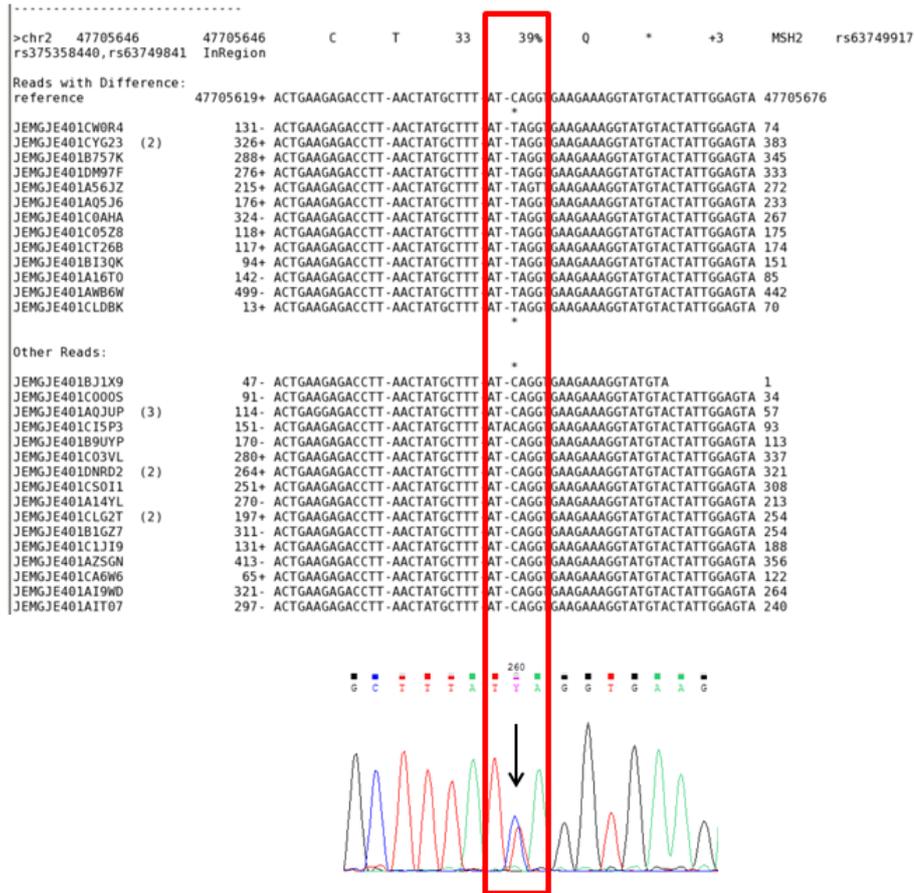


Рисунок 50 - Герминальная мутация с.2446C>T в 14 экзоне гена *MSH2* в гетерозиготном состоянии, диагностированная с помощью NGS и подтвержденная секвенированием по Сэнгеру.

У одного больного носительство патогенной герминальной мутации, выявленной при NGS-диагностике, подтверждено в образце опухолевой ткани (рисунок 51). Наличие только мутантного аллеля свидетельствует о потере гетерозиготности в данном локусе, отражая патогенетическую природу наследственно-обусловленного рака толстой кишки, т.е. теорию Кнудсона, two-hit hypothesis, о биаллельной инактивации гена для фенотипической реализации заболевания.

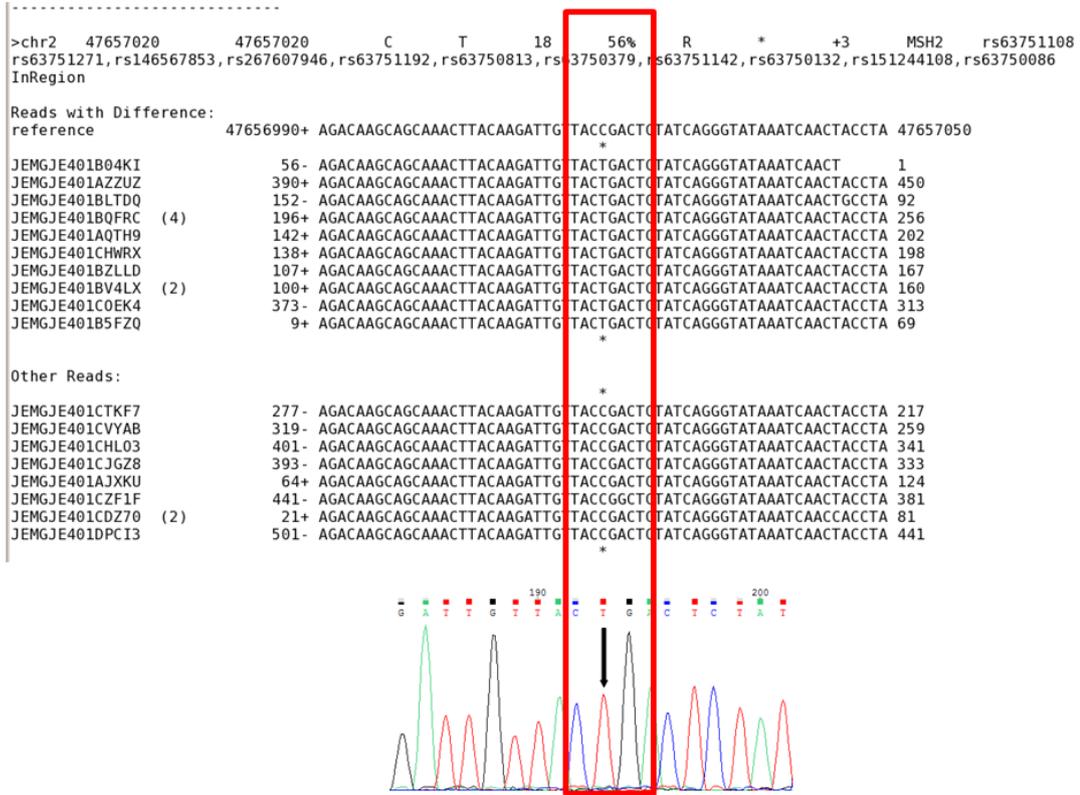


Рисунок 51 - Герминальная мутация с.1216C>T в 7 экзоне гена *MSH2* в гомозиготном состоянии (потеря гетерозиготности), диагностированная с помощью NGS и подтвержденная секвенированием по Сэнгеру в образце опухолевой ткани.

В таблице 48 представлены все экзонные варианты, определенные в генах, включенных в диагностическую панель.

Таблица 48 - Экзонные варианты, определенные в генах, включенных в диагностическую панель (подчеркнуты – клинически незначимые варианты, курсивом обозначены варианты с неизвестным клиническим значением, жирным шрифтом выделены патогенные клинически значимые варианты).

<i>MUTYH</i>	<i>EPCAM</i>	<i>MSH2</i>	<i>MSH6</i>	<i>MLH1</i>	<i>APC</i>
<u>rs74318065</u>	<u>rs1126497</u>	<u>rs4987188</u>	<u>rs1800932</u>	<u>rs1799977</u>	<u>rs2229992</u>
<u>rs3219489</u>		<u>rs2303424</u>	<u>rs1800935</u>	<u>rs9876116</u>	<u>rs351771</u>
<i>rs201103359</i>		rs63750403	<u>rs1800937</u>	c.844dupA	<u>rs465899</u>
<i>rs3219484</i>		rs63749917	<i>rs1393668821</i>	c.2005G>T	<u>rs41115</u>
		rs63751108		rs63751615	<u>rs42427</u>

					<u>rs866006</u>
					<i>rs459552</i>
					<u>rs147036141</u>
					<u>rs147972247</u>
					c.1524_1528del5
					rs398123118
					rs137854574
<i>PMS2</i>	<i>BMP1A</i>	<i>PTEN</i>	<i>CHEK2</i>	<i>CDH1</i>	<i>TP53</i>
<u>rs41534544</u>	<u>rs35572415</u>	<u>rs150651961</u>	<i>rs200928781</i>	<u>rs1801552</u>	<i>rs56275308</i>
<u>rs1805321</u>			<i>rs202089930</i>	<i>rs35187787</i>	
<u>rs1805319</u>			<u>rs142692907</u>		
<u>rs2228006</u>			rs17879961		
<i>rs63750668</i>					
<i>rs63751132</i>					
<u>rs1805324</u>					
<i>rs63750055</i>					
<i>rs2228007</i>					
<u>rs1805318</u>					

В нашем исследовании в генах *APC* и *PMS2* отмечена самая высокая частота полиморфных вариантов строения (24% и 20%, соответственно). В структуре выявленных изменений доминировали миссенс-мутации и синонимичные замены (48% и 34%, соответственно). Патогенные клинически значимые мутации составили 20% от числа всех выявленных вариантов, варианты с неизвестным клиническим значением (VUS) – 24% (рисунок 50).

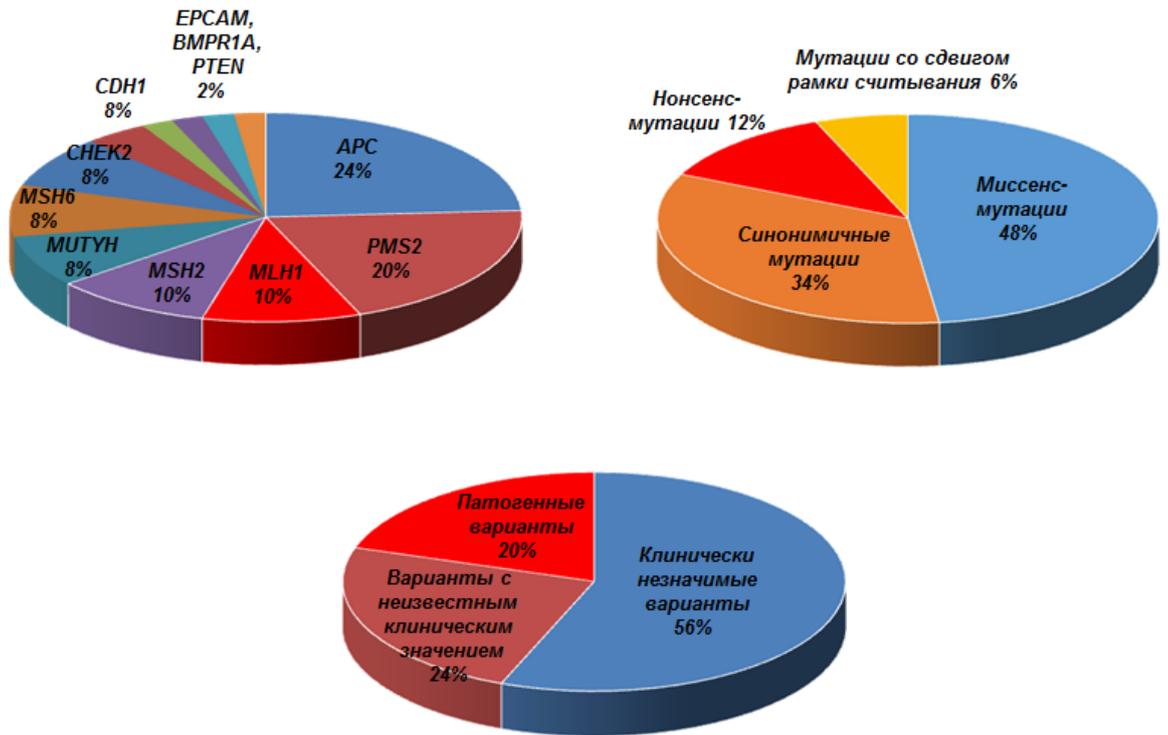


Рисунок 52 – Спектр и частота диагностированных вариантов с помощью NGS.

С помощью биоаналитических программ Mutation Taster, SIFT, Provean и Human Splicing Finder оценена функциональная значимость вариантов с неизвестным клиническим значением, выявленных в нашем исследовании (таблица 49).

Таблица 49 - Результаты оценки функциональной значимости вариантов с неизвестным клиническим значением.

	Mutation Taster	SIFT	Provean	Human Splicing Finder
rs201103359	disease causing ¹	damaging ²	deleterious ³	alteration of splicing ⁴
rs3219484	polymorphism ⁵	tolerated ⁶	neutral ⁷	alteration of splicing
rs1393668821	disease causing	tolerated	neutral	no impact on splicing ⁸
rs459552	polymorphism	tolerated	neutral	no impact on splicing
rs63750668	polymorphism	tolerated	neutral	alteration of splicing
rs63751132	polymorphism	tolerated	neutral	no impact on splicing

rs63750055	polymorphism	tolerated	neutral	no impact on splicing
rs2228007	polymorphism	tolerated	neutral	alteration of splicing
rs200928781	disease causing	damaging	deleterious	alteration of splicing
rs202089930	disease causing	tolerated	neutral	alteration of splicing
rs35187787	disease causing	damaging	deleterious	alteration of splicing
rs1042522	polymorphism	tolerated	neutral	no impact on splicing

Примечания: 1 – вариант, ассоциированный с риском развития заболевания; 2, 3 – патогенный вариант; 4 – вариант, ассоциированный с изменением сплайсинга; 5 – полиморфизм; 6, 7 – вариант, функционально не значимый; 8 – вариант, не влияющий на сплайсинг.

После оценки первичных данных варианты rs200928781 и rs202089930 в гене *CHEK2* определены как ошибки секвенирования, т.к. ни у одного больного выявленные мутации не подтверждены секвенированием по Сэнгеру. Для вариантов rs201103359 в гене *MUTYH* и rs35187787 в гене *CDH1* все четыре программы подтвердили патогенность.

Гетерозиготная герминальная мутация с.451G>A (p.Ala151Thr, rs201103359) в гене *MUTYH* диагностирована у больной с молекулярно-верифицированным синдромом Линча, миссенс-мутация с.1771G>A (p.Ala592Ser, rs35187787) в гене *CDH1*, также в гетерозиготном состоянии, определена у пациентки с семейным аденоматозным полипозом. В обоих случаях MAF (minor allele frequency, частота минорной аллели) составляет менее 0.01.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Молекулярный профиль спорадического рака толстой кишки

Несмотря на положительные тенденции в своевременной диагностике опухолевого поражения толстой кишки злокачественной природы, примерно в 20-25% случаев РТК продолжает диагностироваться на IV стадии [3, 264, 301], оставаясь некурабельной онкологической патологией с 5-летней ОВ равной 14% [189]. Введение новых режимов химиотерапевтического лечения, молекулярно-направленной терапии с применением моноклональных анти-EGFR и анти-VEGFR антител за последние годы позволило значительно улучшить отдаленные результаты лечения в данной группе больных. Для ряда пациентов с метастатическим РТК (мРТК) хирургическое лечение в комбинации с лекарственной терапией позволяет достигать 5-летней отметки ОВ половине больных [71, 217]. Понимание молекулярного патогенеза РТК и лежащих в его основе молекулярно-генетических нарушений является безусловным фундаментом успешного терапевтического лечения больных колоректальным раком.

РТК является крайне гетерогенным заболеванием и на молекулярном, и на клиничко-морфологическом уровне. Одобренная Международным консорциумом, но не рекомендованная для клинического применения, молекулярная классификация РТК включает 4 основных подтипа, отнесение к которым основывается на соматическом профиле опухоли, учитывающем дисрегуляцию основных молекулярных путей, мутационную нагрузку, наличие/отсутствие хромосомной и/или микросателлитной нестабильности, статус метилирования, иммунное окружение, метаболическую дисрегуляцию, стромальную инвазию и ангиогенез [42, 94, 185]. Если сама классификация еще не утверждена для клинического применения, то ДНК-тестирование на предмет наличия соматических мутаций в генах *RAS/BRAF* на сегодняшний день является стандартом при назначении анти-EGFR-моноклональных антител и ингибиторов *BRAF*-киназ больным диссеминированным РТК [185], определение статуса

микросателлитной нестабильности рекомендовано всем пациентам с опухолями толстой кишки при отсутствии признаков САП/АСАП для исключения СЛ, а также при определении стратегии адъювантного лечения и иммунотерапии РТК [184, 185].

Для изучения молекулярного профиля колоректального рака в настоящее исследование включены 140 больных генерализованным РТК, из них у 57,1% пациентов (n=80) очаги отдаленного метастазирования диагностированы на момент постановки диагноза и у 43% больных (n=60) зарегистрирован возврат заболевания. Вся когорта пациентов по клинико-морфологическим характеристикам соответствовала представленным ранее результатам аналогичных исследований [52, 129, 220, 289, 302]. Так, в работе Yaeger и соавт. среди 1 134 больных метастатическим РТК, включенных в исследование, доля I, II, III и IV стадий составила 3,6%, 11,6%, 24,3% и 60,4%, соответственно [289] (в нашей работе - в 2,1%, 16,4%, 24,3% и 57,1%). В аналогичном исследовании Chong и соавт. только в 15% РТК диагностирован на I-II стадии [52]. В целом, для мРТК было характерно доминирование левостороннего поражения, высокая частота опухолей низкой степени дифференцировки с лимфоваскулярной и перинеуральной инвазией, прорастание опухолью всех слоев стенки кишки и распространение в окружающие ткани. Средний возраст больных в представленном исследовании составил 55,1 год, по данным аналогичных работ возрастной показатель приближается к 60-летней отметке, однако, данное значение значительно варьирует и зависит от выборки пациентов, включенных в исследование [52, 129, 220, 289, 302]. Соотношение мужчин и женщин также является переменным без достоверного доминирования одного из полов по данным разных авторов [52, 129, 220, 289, 302]. В нашем исследовании мужчины и женщины по частотному показателю не отличались (49,3% и 50,7%, соответственно).

Всем больным генерализованным РТК в представленном исследовании определен статус генов *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* в образцах опухолевой ДНК. Соматические мутации во 2 и 3 экзонах гена *KRAS* выявлены у 65 из 140 (46,4%)

пациентов, во 2, 3 и 4 экзонах гена *NRAS* – у 12 из 140 (8,6%) больных и в 11 и 15 экзонах гена *BRAF* у 16 из 140 (11,4%) пациентов.

Частота соматических мутаций в гене *KRAS* в образцах опухолевой ткани больных мРТК по данным генотипирования в многочисленных международных исследованиях в среднем составляет 40,7% (от 30% до 50%) (таблица 50). Представленные нами данные *KRAS*-тестирования последовательно согласуются с опубликованными ранее результатами. До 2017 г. стандартная регламентированная панель для *KRAS*-генотипирования включала только 12 и 13 кодоны [323], на долю которых приходится до 90% соматических мутаций в данном гене. В большинстве ранних работ, посвященных изучению молекулярного профиля мРТК, особенно в рамках оценки эффективности антиEGFR-терапии, авторы ограничивались исследованием только 2 экзона гена *KRAS* (таблица 50). Последующие исследования показали, что около ¼ случаев мРТК с «диким типом» 12 и 13 кодонов гена *KRAS* накапливают мутации или в других экзонах гена *KRAS*, или в генах *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* и служат возможным объяснением неэффективности анти-EGFR-терапии у данных больных [93, 205, 228, 264]. С 2017 г. согласно клиническим рекомендациям ASCO, позже NCCN, *KRAS*-тестирование с применением расширенной диагностической панели, включающей 12, 13, 59, 61, 117 и 146 кодоны, является предпочтительным и рекомендовано всем больным мРТК [185]. Изучение только 2 и 3 экзонов гена *KRAS* позволяет повысить диагностическую чувствительность до 94-95% (что продемонстрировано и в нашей работе), однако, не является приоритетным, а включение в диагностический объем 4 экзона гена *KRAS* является на сегодняшний день обязательной компонентой ДНК-генотипирования при определении стратегии таргетного лечения у больных мРТК.

Таблица 50 - Частота соматических мутаций в генах *RAS/BRAF* в образцах опухолевой ткани больных мРТК в международных исследованиях.

Исследование	N	Частота патологического генотипа		
		<i>mutKRAS</i> , %	<i>mutNRAS</i> , %	<i>mutBRAF</i> , %
Richman и соавт., 2009 [220]	711	43,3 2, 3 экзоны	-	7,9 V600
Tol и соавт., 2010 [268]	559	39,4 2 экзон	-	8,7 V600
De Roock и соавт., 2010 [228]	747	38,0 2, 3 экзоны 2,0 4 экзон	2,6 2, 3, 4 экзоны	4,7 V600, D549
Yokota и соавт., 2011 [295]	229	34,5 2, 3 экзоны	-	6,5 V600
Douillard и соавт., 2010, 2013 [63, 64]	1 096	44,0 2, 3 экзоны 6,0 4 экзон	6,0 2, 3, 4 экзоны	8,0 V600
Peeters и соавт., 2010, 2013 [204, 205]	320	45,0 2, 3 экзоны	5,0 2, 3 экзоны	7,0 V600
Kawazoe и соавт., 2015 [129]	264	34,1 2 экзон 3,8 3,4 экзоны	4,2 2, 3 экзоны	5,4 V600
Foltran и соавт., 2015 [73]	194	45,4 2, 3 экзоны 2,0 4 экзон	3,6 2, 3 экзоны	5,2 15 экзон
Chiu и соавт., 2017 [49]	245	38,9 2 экзон 9,0 3,4 экзоны	4,5 2, 3, 4 экзоны	5,7 кодирующая часть
Fujiyoshi и соавт., 2017 [77]	401	46,7 2, 3, 4 экзоны	3,3 2, 3 экзоны	6,3 15 экзон
Liu и соавт., 2018 [152]	461	43,6 2, 3 экзоны 5,2 4 экзон	2,8 2, 3, 4 экзоны	5,6 15 экзон

Yaeger и соавт., 2018 [289]	1 134	44,0 2,3,4 экзоны	3,9 2, 3, 4 экзоны	8,5 кодирую щая часть
Rebersek и соавт., 2019 [217]	154	42,0 2, 3 экзоны	-	3,0 V600
Wojas-Krawczyk и соавт., 2019 [287]	102	22,5 2 экзон 2,95 3,4 экзоны	3,9 2, 3, 4 экзоны	6,9 V600
Innocenti и соавт., 2019 [111]	843	24,9 2, 3 экзоны 3,3 4 экзон	3,4 2, 3, 4 экзоны	11,9 15 экзон
Среднее значение		41,4	3,9	6,8

Патологический *NRAS*-генотип в нашем исследовании диагностирован с высокой частотой (8,6%), что, практически двукратно превышает средний показатель в аналогичных зарубежных исследованиях, в которых, однако, отмечается достаточная частотная вариация от 2,6% до 6,0% (таблица 50). Диагностическая панель, использованная в нашей работе для генотипирования опухолевой ДНК, включила максимально рекомендуемый перечень мутаций, покрывающий 2, 3 и 4 экзоны гена *NRAS*. Выявленное частотное различие может быть обусловлено выборкой больных, включенных в исследование.

Активирующие соматические *BRAF*-мутации определены в 11,4% случаев в нашей работе, что также превышает средний показатель, однако, не противоречит результатам других исследований (таблица 50). В отличие от *RAS*-генов, где мутационный профиль достаточно широк, 600 кодон в гене *BRAF* ответственен за ~ 98% всех детектируемых мутаций [120], в связи с чем, анализ 15 экзона гена *BRAF* является регламентированным оптимумом для больных мРТК наряду с 2, 3 и 4 экзонами генов *KRAS* и *NRAS*.

Т.к. в нашем исследовании основным конечным показателем являлась выживаемость без прогрессирования, для минимизации влияния фактора опухолевой эволюции, в качестве биологического материала для тестирования генов MAPK-сигнального пути предпочтительно выступили архивные

(заключенные в парафиновые блоки) образцы опухоли из первичного или метастатического очагов для больных IV стадией РТК и из рецидивной опухоли и/или очага вторичного поражения для пациентов с рецидивом/прогрессированием основного заболевания после окончания специфического лечения. Выделение ДНК проводилось только после патоморфологического контроля, что является, согласно рекомендациям ASCO и NCCN, обязательным условием для получения валидных результатов [185]. По данным мета-анализа, объединившего 61 клиническое исследование, конкордантность мутационного профиля между первичным и метастатическим очагами для гена *KRAS* составляет 93%, для *NRAS* – 100%, для *BRAF* – 99,4%, что позволило прийти к заключению о равнозначной диагностической значимости *RAS/BRAF*-тестирования и в первичной опухоли, и в очаге метастатического поражения [22]. Аналогичные результаты продемонстрированы и в других исследованиях и для тестирования генов MAPK-киназного пути, и для статуса микросателлитной нестабильности. Показатель конкордантности для MSI-High и MSS в исследуемых образцах составляет 87,5% и 100%, соответственно, по данным Fujiyoshi и соавт. [78, 134].

Если, в общей группе больных РТК, частота соматических мутаций в генах *RAS/BRAF* в образцах РТК возрастает прямо пропорционально стадии заболевания, т.е. если вероятность определить патологический *KRAS*, *NRAS* и *BRAF*-генотипы у больного I стадией РТК составляет 39,1%, 2,4% и 3,4%, то на IV стадии - 46,7%, 3,3% и 6,3%, соответственно [77]. Т.к. соматические мутации в генах *RAS/BRAF* являются драйверными событиями и играют важную роль в индукции диспластических изменений, а также в поддержании опухолевой прогрессии, данная тенденция в частотных различиях является закономерной [95]. Патологическая активация MAPK- и PIK3CA-сигнальных путей, наблюдающаяся в большинстве эпителиальных опухолей толстой кишки, повышает вероятность рецидива даже у больных РТК с крайне благоприятным прогнозом. В исследовании Bonetti и соавт. показано, что частота соматических мутаций в генах *KRAS* и *PIK3CA* у больных I стадией РТК, переживших 5-летнюю отметку ОВ,

была достоверно ниже ($p=0.019$) в сравнении с данным показателем у больных, погибших от прогрессирования основного заболевания [30]. Авторы пришли к заключению, что клиническое течение РТК ранних стадий с ко-мутациями в генах *KRAS* и *PIK3CA* аналогично опухолям толстой кишки, диагностированным на IV стадии, и ассоциировано с негативным прогнозом и риском развития отдаленных метастазов. Схожие результаты продемонстрированы в работе Niю и соавт. для пациентов с III стадией РТК [188]. Генотип реализуется через фенотип, т.е. клиническое течение колоректального рака является отражением молекулярного портрета опухоли. Для естественной опухолевой прогрессии необходим временной интервал для достижения метастатического потенциала. Чем раньше диагностировано заболевание, тем менее вероятность накопления необходимых молекулярно-генетических событий. Т.е. РТК I-II стадии с возвратом заболевания представлен исходно опухолью с мутационной нагрузкой достаточной для рецидива и отдаленного метастазирования. Отсюда, высокая частота *RAS/BRAF*-мутаций в данной группе больных, что показано и в нашем исследовании, у всех троих больных I стадией и более половины пациентов II-III стадий РТК выявлен патологический генотип (100%, 56,5% и 55,9%, соответственно).

При оценке корреляции между клиничко-морфологическими данными и генетическим статусом пациенты с *KRAS*-ассоциированным РТК в нашей работе достоверно не отличались от больных РТК с *wtRAS/BRAF*. Пациенты с соматическими *KRAS*- мутациями характеризовались более молодым возрастом развития заболевания (55,2 лет), что отличается от опубликованных ранее данных. Так, в работе Sersek и соавт. [45] средний возраст составил 58,4 лет, по данным Wojas-Krawczyk и соавт. [177] - 64 года, в исследовании Foltran и соавт. [73] – 67 лет, Kawazoe и соавт. [129] – 64 года. Доминирование женщин в *KRAS*-группе в нашей работе согласуется с данными Phipps и соавт. и Zlobec и соавт. [208, 302], однако расходится с более поздними работами [94, 129, 234], что может быть обусловлено различными выборками больных, включенных в исследование. Локализация опухолей преимущественно в левых отделах толстой кишки, преобладание умереннодифференцированной а, более денокарциномы, высокий

процент больных IV стадией с соматическими мутациями в гене *KRAS* по сравнению с контрольной группой в нашем исследовании согласуются с представленными ранее результатами международных исследований [73, 118, 129, 165, 208, 234, 287, 302].

Несмотря на то, что *NRAS*-ассоциированный РТК по своим клиническим и морфологическим данным приближался к опухолям с *KRAS*-мутациями и статистически значимо не отличался от больных *wtRAS/BRAF*-РТК, выявленные отличия характеризуют *NRAS*-генотип как маркер агрессивного клинического течения: детекция только у пациентов с III и IV стадиями, во всех случаях - распространение опухоли за пределы стенки кишки, поражение более трех регионарных лимфоузлов у 50% больных. Наши результаты подтверждают данные крупного исследования, в котором анализ клиничко-морфологических данных 2 764 пациентов с мРТК, позволил характеризовать РТК с соматическими *NRAS*-мутациями как самостоятельный подтип, ассоциированный с неблагоприятным прогнозом [45].

Сопряженность с СИМР-фенотипом и гипермутабельным статусом определяют высокий метастатический потенциал опухолей самой прогностически неблагоприятной группы РТК с соматическими *BRAF*-мутациями (подгруппа CMS1, тип 1 по классификации Jass, гипермутированный вариант согласно TCGA) [94, 96, 118, 180, 208]. *BRAF*-ассоциированный РТК ассоциирован с «зубчатым» канцерогенезом и характеризуется клиническими и морфологическими чертами, отличающими его от *RAS*-фенотипа: поздний возраст развития заболевания, преобладание женского пола, поражение правой половины ободочной кишки, высокая частота муцинозных аденокарцином и опухолей низкой степени дифференцировки, в подавляющем большинстве случаев III-IV стадии на момент диагностики. В нашем исследовании положительный *BRAF*-статус полностью отвечает представленным ранее данным, за исключением возраста манифестации РТК (65 лет vs 54,8 лет в настоящей работе), что, вероятно, обусловлено, выборкой больных.

Помимо *RAS/BRAF*-статуса 128 пациентам в настоящем исследовании выполнен анализ микросателлитной нестабильности в образцах опухолевой ткани. Панель маркеров включила 5 однонуклеотидных повторов: BAT25, BAT26, NR21, NR24, NR27, обладающих высокими показателями чувствительности, специфичности и органопринадлежности, т.е. высокой избирательностью в отношении микросателлитной нестабильности, обусловленной, нарушениями именно системы репарации неправильно спаренных оснований. Частота опухолей с высоким уровнем нестабильности, т.е. наличием двух и более нестабильных маркеров, составила 10,7%, что превышает средний показатель MSI-High в аналогичных исследованиях, однако, не расходится с данными ряда авторов (таблица 51).

Таблица 51 - Частота MSI-High в образцах опухолевой ткани больных мРТК в зарубежных исследованиях.

Исследование	N	MSI-High, %
Tran и соавт., 2010 [270]	350	11,0
Goldstein и соавт., 2014 [87]	870	6,3
Venderbosch и соавт., 2014 [274]	3 063	5,0
Nam и соавт., 2016 [184]	191	1,6
Fujiyoshi и соавт., 2017 [77]	2 439	5,9
Liu и соавт., 2018 [152]	461	6,5
Chong и соавт., 2019 [52]	598	10,1
Innocenti и соавт 1., 2019 [111]	843	6,0
Yaeger и соавт 1., 2019 [289]	1 134	8,7
Среднее значение		6,8

И в нашей работе, и в зарубежных исследованиях частота MSI-High в опухоли у больных генерализованным РТК ожидаемо ниже в сравнении со средней 15%-частотой в неотобранной выборке больных колоректальным раком. Данный факт объясняется тем, что микросателлитная нестабильность является

фактором благоприятного прогноза при локализованном РТК, особенно при I-II стадиях заболевания, улучшая показатели как общей, так и безрецидивной выживаемости [291]. Положительный прогностический эффект MSI-High нивелируется у больных III стадией [132, 175] и полностью утрачивается у пациентов мРТК, где высокий уровень микросателлитной нестабильности становится фактором неблагоприятного исхода [291].

Выделение группы с низким уровнем микросателлитной нестабильности в самостоятельный молекулярный подтип остается на сегодняшний день дискуссионным [101, 185, 208] ввиду приближенности по клинико-морфологическим характеристикам к РТК со стабильной системой репарации. Возможной причиной данного феномена является инактивация гена *MSH3*, встречающаяся с высокой частотой в опухолевой ткани. Двойная гетерозиготность или носительство герминальных мутаций в гене *MSH3* в гомозиготном состоянии приводит к развитию наследственно-обусловленного олигополиозного варианта РТК [101]. В нашем исследовании для анализа клинических, морфологических особенностей, прогностического влияния пациенты с MSS-РТК и MSI-Low-РТК объединены в одну группу.

РТК, ассоциированный с MSI-High, чаще диагностируется у женщин, характеризуется преимущественно правосторонним поражением толстой кишки, высокой частотой опухолей муцинозной дифференцировки высокой степени злокачественности, лимфоцитарной инфильтрацией, у больных III-IV стадий – лимфоваскулярной и периневральной инвазией [132, 175]. Все представленные клинико-морфологические данные согласуются с результатами нашего исследования.

Высокий уровень микросателлитной нестабильности часто сочетается патологическим *BRAF*-генотипом (до 50% случаев), преимущественно в опухолях с CIMP-фенотипом и эпимутацией в гене *MLH1*, что обусловлено общностью патогенетических путей развития. Отсюда, крайне высокая конкордантность фенотипических проявлений: правосторонний рак у больных старшей возрастной группы, чаще у женщин, с муцинозным гистотипом, низкой степени

дифференцировки, высокой частотой раннего регионарного и отдаленного метастазирования. В нашей работе данное сочетание отмечено в 26,6% случаев с высокой корреляцией клинико-морфологических характеристик.

Молекулярный патогенез объясняет не только сочетание MSI-High с активирующими мутациями в гене *BRAF*, но и, в целом, соматический *RAS/BRAF*-статус, а также частоту MSI в опухоли, которые существенно разнятся у больных раком ободочной и прямой кишки. Различные эмбриогенез, анатомическое строение и функциональная активность ободочной и прямой кишки, определяют различия в морфологии, клиническом течении и лечении локализованных форм рака указанных локализаций. Хромосомная нестабильность, *HER1/2*-амплификация с активацией *EGFR*-киназного пути, низкая мутационная нагрузка являются ведущими молекулярно-генетическими чертами опухолей дистальных отделов толстой кишки [172]. В то время как микросателлитная нестабильность, *CIMP*-фенотип, гипермутабельный статус, сопряженность с *BRAF*-мутациями характеризуют правосторонний рак ободочной кишки [172]. Чем дистальнее локализуется опухоль, тем более она приобретает черты хромосомно-нестабильного варианта РТК и утрачивает признаки проксимальных новообразований, в т.ч. зубчатой природы. Данная закономерность прослеживается и в отношении метастатических очагов. Т.к. локализация первичной опухоли, в т.ч. ее молекулярная природа, определяют потенциальный метастатический паттерн [105], то частота детектируемых соматических мутаций разнится в метастатических опухолях. Если частота вторичного поражения печени значительно не отличается у больных раком ободочной и прямой кишки, то интраабдоминальное метастазирование характерно для опухолей проксимальной локализации, а поражение легких и головного мозга чаще диагностируется при опухолях прямой кишки [105]. Отсюда, высокая частота соматических *KRAS/NRAS*-мутаций при вторичном поражении легких, активирующих *BRAF*-мутаций - при вовлечении брюшины и локо-регионарных рецидивах [105, 153]. Данные закономерности прослеживаются и в результатах нашего исследования. В опухолях сигмовидной и прямой кишки отмечен наибольший частотный

показатель *RAS*-мутаций (30% и 27%, 23% и 40% для *mutKRAS* и *mutNRAS*, соответственно). Мутантный *BRAF*-генотип, а также высокий уровень микросателлитной нестабильности превалировали у больных раком проксимальных отделов ободочной кишки (68,7% и 46,7%, соответственно). При метастатическом поражении легких закономерно зарегистрирован высокий процент *mutKRAS* (59,3%), при вовлечении брюшины - патологический *BRAF*-генотип и MSI-High (23,8% и 23,8%, соответственно).

С целью определения различий в соматическом профиле опухолей толстой кишки у больных молодого возраста и старшей возрастной категории все пациенты стратифицированы в две группы: <50 лет и >50 лет. Данное демаркационное возрастное значение является унифицированным, учитывается пересмотренными рекомендациями Бетезда при отборе больных для исключения наследственного РТК в составе синдрома Линча и является возрастной отметкой начала проведения скрининговых программ для своевременной диагностики и лечения пред- и опухолевой патологии толстой кишки в общей популяции [184, 185, 271]. Все случаи РТК до 50 лет принято относить к «молодому РТК», хотя в ряде иностранных работ данная возрастная граница понижена до 45 лет и моложе, особенно в исследованиях, посвященных изучению наследственного фактора в патогенезе РТК. Данная тенденция отчетливо прослеживается в исследованиях до 2015 г., в работах последних лет в определении “early onset colorectal cancer” (англ., рак толстой кишки с манифестацией в молодом возрасте) доминирует цифра 50, как отражение регламентированных сроков начала скрининговых мероприятий (таблица 52). Однако, учитывая существующие тенденции роста заболеваемости РТК среди лиц моложе 50 лет данная возрастная граница требует пересмотра (по предварительным расчетам, показатель заболеваемости раком ободочной и прямой кишки для возрастной группы от 20 до 34 лет к 2030 году вырастет на 90% и 124,2%, соответственно, и на 46% - для контингента от 35 до 49 лет [14]).

Таблица 52 - Возрастной ценз больных РТК в молодом возрасте в публикациях 1990-2019 гг.

Автор	Год	Публикация	Возраст
Isbister и соавт. [112]	1990	Large-bowel cancer in the young: a national survival study	<40
Palmer и соавт. [195]	1991	Colorectal adenocarcinoma in patients less than 40 years of age	<40
Lee и соавт. [145]	1994	Colorectal cancer in young patients: characteristics and outcome	<40
Yilmazlar и соавт. [294]	1995	Colorectal cancer in young adults	
Fante и соавт. [68]	1997	Colorectal carcinoma in different age groups: a population-based investigation	<40
Soliman и соавт. [251]	1997	Colorectal cancer in Egyptian patients under 40 years of age	<40
Minardi и соавт. [171]	1998	Colorectal cancer in the young patient.	<40
Chung и соавт. [54]	1998	Young age is not a poor prognostic marker in colorectal cancer	<40
Liang и соавт. [147]	2003	Clinicopathological and molecular biological features of colorectal cancer in patients less than 40 years of age	<40
Alici и соавт. [7]	2003	Colorectal cancer in young patients: characteristics and outcome	<40
Losi и соавт. [153]	2005	Molecular genetic alterations and clinical features in early-onset colorectal carcinomas and their role for the recognition of hereditary cancer syndromes.	<45
Torsello и соавт. [269]	2008	P53 and bcl-2 in colorectal cancer arising in patients under 40 years of age: distribution and prognostic relevance	<40
Makela и соавт. [158]	2010	Clinicopathological features of colorectal cancer in patients under 40 years of age	<40
Chang и соавт. [48]	2012	Clinicopathologic and molecular features of sporadic early-onset colorectal adenocarcinoma: an adenocarcinoma with frequent signet ring cell differentiation, rectal and sigmoid involvement, and adverse morphologic features	<40
Myers и соавт. [182]	2013	Colorectal cancer in patients under 50 years of age: a retrospective analysis of two institutions' experience	<50
Arriba и соавт. [11]	2015	DNA Copy Number Profiling Reveals Different Patterns of Chromosomal Instability Within Colorectal Cancer According to the Age of Onset	<45
Inra, Syngal [108]	2015	Colorectal cancer in young adults	<50
Ballester и соавт. [15]	2016	Clinical and molecular features of young-onset colorectal cancer	<50
Watson и соавт. [281]	2016	High frequency of KRAS mutation in early onset colorectal adenocarcinoma: implications for pathogenesis.	<40
Khan и соавт. [131]	2016	Colorectal cancer in the very young: a comparative study of tumormarkers, pathology and survival in early onset and adult onset patients	<30

Pearlman и соавт. [203]	2017	Prevalence and Spectrum of Germline Cancer Susceptibility Gene Mutations Among Patients With Early-Onset Colorectal Cancer	<50
Yeо и соавт. [293]	2017	Early-onset Colorectal Cancer is Distinct From Traditional Colorectal Cancer	<50
Patel, Anhel [202]	2018	Colorectal cancer in the young	<50
Stoffel и соавт. [255]	2018	Germline Genetic Features of Young Individuals With Colorectal Cancer	<50
Cavestro и соавт. [44]	2018	Early onset sporadic colorectal cancer. Worrisome trends and oncogenic features	<50
Limaiem и соавт. [150]	2018	Colorectal cancer in young adults: a retrospective study of 32 tunisian patients	<40
Jacobs и соавт. [115]	2018	Defining Early-Onset Colon and Rectal Cancers	<45 (обод. кишка) <55 (прямая кишка)
Mauri и соавт. [166]	2018	Early-onset colorectal cancer in young individuals	<50
Thutkawkorapin и соавт. [265]	2019	Exome sequencing in 51 early onset non-familial CRC cases	<40
Willauer и соавт. [283]	2019	Clinical and molecular characterization of early-onset colorectal cancer	<50
Puccini и соавт. [212]	2019	Impact of Patient Age on Molecular Alterations of Left-Sided Colorectal Tumors	<45

Более высокая частота наследственной патологии у пациентов молодого возраста (до 22-25%) объясняет амбивалентность клинико-морфологических характеристик больных в соответствующих исследованиях [202]. Несмотря на природу заболевания, однако, больные молодого возраста характеризуются большей частотой поражения левых отделов толстой кишки [6, 131, 260, 293], в т.ч. прямой кишки, что показано и в нашей работе (51,2% vs 22,2%, $p < 0.001$). Более высокий относительный риск регионарного и отдаленного метастазирования (RR 1.37 и 1.58) обуславливает доминирование III и IV стадии у пациентов младше 50 лет [6], что коррелирует с представленными результатами. Морфологические различия, представленные в аналогичных исследованиях, в т.ч. более высокая частота муцинозных аденокарцином, а также опухолей низкой степени дифференцировки [6, 131, 182, 260], не достигли статистической значимости для нашей выборки больных.

Частота соматических мутаций в генах *RAS/BRAF* в разных возрастных категориях варьирует в различных исследованиях и зависит от выборки больных, локализации опухоли, стадии процесса [41, 146]. В целом, пациенты молодого возраста характеризуются высоким уровнем мутационной нагрузки (tumour mutation burden TMB-High>17 мутаций/Mb) [33]. В нашем исследовании частотных различий достигли значения для *BRAF*- и *NRAS*-мутаций, при этом более высокая частота *mutBRAF* отмечена в группе пожилого возраста (7,0% vs 13,4%), а доля *NRAS*-мутаций была выше у молодых больных (11,6% vs 7,2%), что согласуется опубликованными ранее данными [103, 129, 234, 282]. Высокий процент *KRAS*-мутаций отмечен в обеих возрастных группах (44,2% и 47,4%, соответственно). Доля пациентов с высоким уровнем микросателлитной нестабильности была сопоставима у больных моложе и старше 50 лет (11,6% и 10,3%, соответственно).

Исторически, анализ общей выживаемости является «золотым стандартом» при оценке отдаленных результатов лечения больных генерализованным раком толстой кишки, так же, как и большинства солидных опухолей на стадии отдаленного метастазирования [170, 178]. Являясь самой объективной конечной точкой большинства клинических исследований, ОВ, однако, не позволяет оценить краткосрочный эффект проводимого лечения, определяет дополнительные финансовые затраты, а результаты значительно зависят от объема выборки [222, 230]. Суррогатные конечные точки (СКТ), такие как, выживаемость без прогрессирования, позволяют, при снижении затрат на клиническое испытание, оценить эффективность начатого лечения, провести его коррекцию, а также ускорить процесс клинической валидации новых режимов лекарственной терапии, сертификации и коммерциализации новых противоопухолевых препаратов [55]. ВБП является надежной и одобренной СКТ при оценке результатов лечения больных мРТК, получающих химиотерапевтическое лечение, демонстрируя высокую прогностическую значимость и, что немаловажно, высокую корреляцию с ОВ [299]. Однако, расширение терапевтических возможностей, в т.ч. внедрение молекулярно-направленной терапии, значительно

увеличило за последние годы число пациентов, получающих две и более линий химиотерапии в комбинации с новыми таргетными препаратами, что, свою очередь, определило тренд в расширении показаний для хирургического лечения в данной группе больных [178]. Обозначенные факты поставили под сомнение применимость ВВП в качестве эффективной СКТ при современных подходах к лечению генерализованных форм РТК у ряда авторов [169, 242], что не нашло подтверждения в работе Montagnani и соавт. в которой показана прогностическая ценность ВВП у больных, леченных с назначением антиангиогенных препаратов [178].

В нашем исследовании в качестве первичной конечной точки определена также ВВП. Факторы, определяющие время до прогрессирования, у больных мРТК, зависят от целей и задач конкретных исследований, а также выборки больных. В нашей работе при оценке факторов, влияющих на риск прогрессирования у больных генерализованным раком толстой кишки, в однофакторный анализ включены следующие независимые переменные: пол, возраст, сторона поражения, степень дифференцировки опухоли, гистологический вариант, стадия на момент постановки диагноза, число зон отдаленного метастазирования, метастатическое поражение брюшины, лекарственное лечение, хирургическое лечение, статус генов *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, статус микросателлитной нестабильности.

Патологический *KRAS*- и *BRAF*-генотипы, высокий уровень микросателлитной нестабильности, метастатическое поражение брюшины, возраст старше 65 лет на момент постановки диагноза, а также хирургическое вмешательство в объеме полной циторедукции обуславливали достоверные различия в выживаемости больных при оценке с помощью теста log-rank. Все указанные предикторы, за исключением канцероматоза брюшины и возрастной категории, подтвердили свою независимую прогностическую значимость при одно- и многофакторном анализе с применением модели пропорциональных рисков Кокса. Для других переменных, в т.ч. мутантного *NRAS*-статуса, статистическая значимость не достигнута.

Гены семейства *RAS*, одни из первых молекулярных маркеров, прогностическое и предиктивное значения которых, были изучены при метастатическом раке толстой кишки, особенно в контексте оценки эффективности терапии анти-EGFR моноклональными антителами. Если патологический статус *RAS*-генов является облигатным маркером в пользу отказа от назначения цетуксимаба или панитумумаба [185], то его влияние на показатели выживаемости разнится в соответствующих исследованиях. В нашей работе медиана времени без прогрессирования у больных с соматическими мутациями в гене *KRAS* составила 11,0 мес., в гене *NRAS* – 12,0 мес., у пациентов с «диким типом» *RAS/BRAF* – 15,0 мес., что, согласуется с опубликованными ранее данными (таблица 53). Статистически значимо больным с отсутствием соматических мутаций в генах *RAS* уступили в выживаемости без прогрессирования только больные с *mutKRAS* ($p=0.011$).

Таблица 53 - Медиана времени до прогрессирования у больных мРТК в зависимости от соматического статуса генов *KRAS* и *NRAS* в зарубежных исследованиях.

Исследование	Медиана времени		Медиана времени	
	<i>mutKRAS</i>	<i>wtKRAS</i>	<i>mutNRAS</i>	<i>wtNRAS</i>
Richman и соавт., 2009 [220]	8 мес.	8,5 мес.	н/д	н/д
Loupakis и соавт., 2009 [154]	3,8 мес. (3, 4 экзоны)	5,1 мес.	н/д ¹	н/д
De Roock и соавт I., 2010 [228]	3 мес.	6 мес.	4 мес.	7 мес.
Modest и соавт., 2016 [174]	9,5 мес.	10,3 мес. (<i>wtRAS/BRAF</i>)	9,5 мес.	10,3 мес. (<i>wtRAS/BRAF</i>)
Liu и соавт., 2018 [152]	21,6 мес. (2, 3 экзоны)	34,5 мес. (<i>wtRAS/BRAF</i>)	н/д	н/д
	15,3 мес. vs 34,5 мес. (4 экзон <i>KRAS</i> и 2, 3, 4 экзоны <i>NRAS</i> vs <i>wtRAS/BRAF</i>)			
Innocenti и соавт., 2019 [111]	9,8 мес. vs 11,1 мес.			

Примечание: 1 – нет данных.

Прогностическая значимость патологической активации гена *KRAS* остается

дискутабельным вопросом. В нашем исследовании показано независимое негативное влияние соматических мутаций в гене *KRAS* на риск прогрессирования РТК (HR 2.149, 95%CI 1.255-3.679, p=0.005), которое не подтверждается рядом международных исследований [83, 217, 220]. Кроме того, в нашей работе *KRAS*-генотипирование выполнено с применением «закрытой» системы Cobas Z, что не позволило оценить частоту и, соответственно, прогностическую значимость, различных вариантов в данном гене, что уже показано в более ранних работах. Так, соматические мутации в 13 кодоне ассоциированы с худшей ОВ по данным Rebersek и соавт. [217] и Yokota и соавт. [295] в сравнении с мутациями в 12 кодоне, что не подтверждается, однако, в исследовании Modest и соавт. [174], где варианты G12C и G12V выступили факторами неблагоприятного исхода. Активирующие мутации в 3 и 4 экзонах гена *KRAS* были ассоциированы с достоверно худшей и ВБП, и ОВ в работе Therikildsen и соавт. [264], но утратили прогностическую значимость для ОВ в исследовании Loupakis и соавт. [154]. Негативный вклад патологической активации гена *KRAS* в выживаемость, как общую, так и без прогрессирования, продемонстрирован также в работах Richman и соавт. [220] и Yaeger и соавт. [289]. В таблице 54 представлено отношение риска прогрессирования РТК в зависимости от *KRAS*-статуса в зарубежных исследованиях.

Таблица 54 - Отношение риска прогрессирования РТК в зависимости от *KRAS*-статуса в зарубежных исследованиях.

Исследование	HR ¹	95% CI ²	p
Loupakis, 2009 3,4 экзоны [154]	0,46	0,11-0,88	0,028
Richman и соавт., 2009 [220]	1,14	0,98-1,33	0,09
De Roock и соавт., 2010 [228]	1,98	1,66-2,36	<0,001
Therikildsen и соавт., 2014 [264]	2,19	1,43-3,35	н/д ³
Modest и соавт, 2016 [174]	1,2	1,02-1,42	0,03
Gao и соавт., 2017 [83]	0,945	0,842- 1,061	0,34
Liu и соавт., 2018 [152]	2,082	1,545-2,805	<0,001
Innocenti и соавт., 2019 <i>KRAS/NRAS</i> [111]	1,36	1,13-1,62	<0,001

Примечание: 1 – отношение риска; 2 – доверительный интервал; 3 – нет данных.

Прогностическое влияние патологического *NRAS*-генотипа также различается в более ранних исследованиях. По нашим данным он не оказывал влияния на ВБП (HR 1,026, 95%CI 0.373-2.820, $p=0.960$), что соотносится с результатами De Roock и соавт. [228], Modest и соавт. [174]. Однако, в ряде работ соматические мутации в гене *NRAS* выступали статистически значимыми предикторами худшей выживаемости (и ОВ, и ВБП) [152, 264, 289].

Активирующие мутации в гене *BRAF*, являющиеся фактором неблагоприятного прогноза у больных и локализованным, и диссеминированным РТК [84, 152, 154, 174, 220], ассоциированы с ВБП, редко превышающей 6-8 месяцев (таблица 55), что показано и в нашей работе. Медиана времени до прогрессирования у больных *mutBRAF*-РТК составила 6 мес., что двукратно ниже аналогичного показателя у пациентов с отсутствием соматических мутаций (12 мес.).

Таблица 55 - Медиана времени до прогрессирования у больных мРТК в зависимости от соматического статуса гена *BRAF* в зарубежных исследованиях.

Исследование	Медиана времени	
	<i>mutBRAF</i>	<i>wtBRAF</i>
Richman и соавт., 2009 [220]	6,5 мес.	8,5 мес.
Loupakis и соавт., 2009 [154]	2,6 мес.	4,4 мес.
De Roock и соавт., 2010 [228]	2 мес.	7 мес.
Vanderbosch и соавт., 2014 CAIRO [274]	5,1 мес.	7,0 мес.
Vanderbosch и соавт., 2014 CAIRO2 [274]	6,9 мес.	10,6 мес.
Vanderbosch и соавт., 2014 COIN [274]	5,8 мес.	6,5 мес.
Vanderbosch и соавт., 2014 FOCUS [274]	8,1 мес.	8,0 мес.
Vanderbosch и соавт., 2014 [274]	6,2 мес.	7,7 мес.
Modest и соавт., 2016 [174]	7,4 мес.	10,3 мес. (<i>wtRAS/BRAF</i>)
Liu и соавт., 2018 [152]	8,6 мес.	34,5 мес. (<i>wtRAS/BRAF</i>)
Innocenti и соавт., 2019 [111]	7,6 мес.	11,4 мес.

Негативное прогностическое влияние на ВБП мутантного статуса гена *BRAF* подтверждено и при многофакторном анализе (HR 4.100, 95%CI 1.802-9.325, $p=0.001$), что прямо коррелирует с более ранними результатами (таблица 56).

Патологическая активация гена *BRAF* выступила самым неблагоприятным фактором прогноза для наших больных. Высокий показатель Hazard Ratio, а также широкий доверительный интервал, обусловлены малым числом случаев *BRAF*-позитивного РТК. Для повышения достоверности представленных результатов необходимо увеличение выборки больных.

Таблица 56 - Отношение риска прогрессирования РТК в зависимости от *BRAF*-статуса в зарубежных исследованиях.

Исследование	HR ¹	95% CI ²	p
Loupakis и соавт., 2009 [154]	0,59	0,24-1,07	0,073
Richman и соавт., 2009 [220]	1,14	0,86-1,52	0,37
De Roock и соавт., 2010 [228]	3,82	2,38-6,12	<0,001
Venderbosch и соавт., 2014 CAIRO [274]	1,57	1,00-2,38	н/д ³
Venderbosch и соавт., 2014 CAIRO2 [274]	2,3	1,65-3,2	н/д
Venderbosch и соавт., 2014 COIN [274]	1,38	1,14-1,68	н/д
Venderbosch и соавт., 2014 FOCUS [274]	0,98	0,74-1,28	н/д
Venderbosch и соавт., 2014 [274]	1,34	1,17-1,54	н/д
Гао и соавт., 2017 [83]	0,954	0,856- 1,064	0,397
Liu и соавт., 2018 [152]	3,864	2,375-6,287	<0,001
Innocenti и соавт., 2019 [111]	1,72	1,3-2,29	<0,001

Примечание: 1 – отношение риска; 2 – доверительный интервал; 3 – нет данных.

Пациенты с «диким типом» по всем трем анализируемым генам характеризовались достоверно лучшей выживаемостью в сравнении с больными с мутантным статусом *KRAS/BRAF* (15 мес vs 11 мес./6 мес., $p < 0.001$). Медиана времени до прогрессирования у больных с отсутствием соматических *RAS/BRAF*-мутаций варьирует в пределах от 6 мес. до 35 мес. в различных исследованиях [129, 152, 174, 220], однако, независимо от причин такого широкого диапазона значений, пациенты с патологическими *RAS/BRAF*-генотипом уступали в выживаемости без прогрессирования больным с «диким» типом указанных генов во всех публикациях.

Высокий уровень микросателлитной нестабильности – третий молекулярный маркер, определивший достоверно худшую выживаемость без

прогрессирования у больных мРТК в сравнении с пациентами со стабильной системой репарации (7,0 мес. vs 12,0 мес., $p=0.005$). Полученные результаты соотносятся с данными аналогичных исследований (таблица 57).

Таблица 57 - Медиана времени до прогрессирования у больных мРТК в зависимости от MSI-статуса в зарубежных исследованиях.

Исследование	Медиана	
	MSI-High	MSS/MSI-Low
Venderbosch и соавт., 2014 CAIRO [274]	5,7 мес.	6,9 мес.
Venderbosch и соавт., 2014 CAIRO2 [274]	7,5 мес.	10,5 мес.
Venderbosch и соавт., 2014 COIN [274]	5,7 мес.	6,5 мес.
Venderbosch и соавт., 2014 FOCUS [274]	8,1 мес.	8,0 мес.
Venderbosch и соавт., 2014 [274]	6,2 мес.	7,6 мес.
Liu и соавт., 2018 [152]	14 мес.	23 мес.
Innocenti и соавт., 2019 [111]	6,6 мес.	11,0 мес.

Биологическое поведение опухолей толстой кишки обусловлено не только активацией MAPK-киназного пути. Молекулярный профиль РТК достаточно гетерогенен и зависит от ряда других генетических и эпигенетических изменений, которые также существенно влияют на фенотип опухоли, определяя успехи или неудачи в лечении РТК. Статус микросателлитной нестабильности наряду с мутационной нагрузкой являются одними из таких маркеров, активно изучающимися в последнее время в связи с успехами в иммунотерапии. Высокий иммуногенный фон, присущий опухолям с MSI-High и High-TMB, определяет крайнюю эффективность ингибиторов иммунного ответа в данной когорте больных. Несмотря на текущие достижения в лекарственном лечении, высокий уровень микросателлитной нестабильности ассоциирован с негативным вкладом в выживаемость больных генерализованным РТК. Так независимое прогностическое влияние на показатели ОВ дефицита в системе репарации неправильно спаренных оснований подтверждено в недавно представленном мета-анализе [291], однако, статистически значимый неблагоприятный прогноз был отмечен только в группе *BRAF*-независимого РТК (HR 1.493, 95% CI 1.187-

1.879, $p < 0.001$). Достоверного вклада MSI-High в ВБП в данном исследовании не показано (HR 1.453, 95% CI 0.920-2.294, $p = 0.109$), так же, как и в работах Liu и соавт. и Innocenti и соавт. [152, 152]. Противоположные результаты продемонстрированы в работах Gavin и соавт. и по данным исследований CAIRO2 и COIN [84, 274] (таблица 58), где высокий уровень микросателлитной нестабильности достоверно ухудшал показатели ВБП. По данным многофакторного анализа в нашей работе MSI-High также выступил как самостоятельный прогностический предиктор неблагоприятного исхода (HR 2.481, 95% CI 1.273-4.837, $p = 0.008$), однако, учитывая крайне малое число наблюдений, достигнутые результаты требуют последующего подтверждения с большим числом клинических наблюдений.

Таблица 58 - Отношение риска прогрессирования у больных MSI-High-ассоциированным РТК в зарубежных исследованиях.

Исследование	HR ¹	95% CI ²	p
Gavin и соавт., 2012 [84]	3,82	2,38-6,12	0,02
Venderbosch и соавт., 2014 CAIRO [274]	1,34	0,81-2,22	н/д ³
Venderbosch и соавт., 2014 CAIRO2 [274]	1,66	1,13-2,45	н/д
Venderbosch и соавт., 2014 COIN [274]	1,56	1,2-2,02	н/д
Venderbosch и соавт., 2014 FOCUS [274]	0,98	0,71-1,35	н/д
Venderbosch и соавт., 2014 [274]	1,33	1,12-1,57	н/д
Gao и соавт., 2017 [83]	0,954	0,856- 1,064	0,397
Liu и соавт., 2018 [152]	0,688	0,435-1,089	0,110
Innocenti и соавт., 2019 [111]	1,02	0,71-1,47	0,912

Примечание: 1 – отношение риска; 2 – доверительный интервал; 3 – нет данных.

Дополнительно, в группе пациентов с отсутствием микросателлитной нестабильности в опухолевой ткани оценено влияние *RAS/BRAF*-генотипа на ВБП. Ожидаемо, самым прогностически неблагоприятным генотипом выступило сочетание MSS с соматическими *BRAF*-мутациями, которое обусловило медиану времени до прогрессирования 7,0 месяцев при 18,0 месяцах в группе MSS/*wtRAS/BRAF* ($p = 0.001$). Оценка ВБП больных MSI-High-РТК в зависимости

от *RAS/BRAF*-статуса не выполнена ввиду малочисленности положительных случаев опухолей с нестабильной системой репарации.

Метастатическое поражение брюшины, наряду с полиорганным поражением, являются признанными факторами негативного прогноза у больных диссеминированным РТК [74, 137, 140, 149]. В нашем исследовании в однофакторный анализ включены оба данных предиктора, продемонстрировавшее в более ранних работах статистически значимое влияние и на общую, и на выживаемость без прогрессирования [74, 137, 140, 149]. Так, по результатам проспективных исследований, представленных рабочей группой ARCAD, больные с изолированным поражением печени и легких характеризуются достоверно лучшими показателями ОВ и ВБП в сравнении с пациентами с канцероматозом брюшины (HR 0.79, 95%CI 0.65-0.95, $p=0.12$ и HR 0.61, 0.49-0.76, $p<0.0001$ для ОВ и 0.8. 95%CI 0.68-0.93, $p=0.0035$ для ВБП). При этом больные с двумя зонами отдаленного метастазирования не уступают в показателях выживаемости пациентам с изолированным поражением брюшины (HR 0.99, 95%CI 0.82-1.20, $p=0.957$) [76].

По нашим данным вовлечение двух и более регионарных зон при метастатическом поражении не было ассоциировано с достоверной разницей в ВБП (HR 1.290, 95%CI 0.812-2.049, $p=0.280$), в то время как канцероматоз брюшины определил 8-месячную медиану времени до прогрессирования, что статистически значимо отличалось от данного показателя у больных без вовлечения брюшины (12 мес., $p=0.048$). При многофакторном анализе, однако, данная прогностическая значимость не нашла своего подтверждения (HR 1.322, 95%CI 0.634-2.754 $p=0.457$).

Мутантный *BRAF*-статус и высокий уровень микросателлитной нестабильности опухоли, вовлечение перитонеальных оболочек закономерно ассоциированы с поражением правых отделов ободочной кишки, что, в целом, и обуславливает худший прогноз выживаемости у больных РТК с проксимальной локализацией опухоли. В работе Gao и соавт. пациенты с правосторонним мРТК достоверно уступили в ВБП больным с поражением левых отделов ободочной

кишки и прямой кишки [83]. Аналогичные результаты достигнуты при оценке ОВ в работе Chiu и соавт. [49]. Для пациентов, включенных в настоящее исследование получены соотносимые данные, не достигшие, однако, статистической значимости как при оценке выживаемости, так и при одно- и многофакторном регрессионном анализе.

Помимо метастатического поражения брюшины, еще одним клиническим показателем, определившим худшую ВБП при однофакторном анализе, однако, утратившим свое прогностическое значение при многофакторном анализе, выступил возраст больных старше 65 лет на момент постановки диагноза. Данный результат может быть обусловлен, с одной стороны, более высокой частотой поражения правых отделов ободочной кишки, ассоциированных и с *mutBRAF*, и с MSI-High, выступивших независимыми негативными предикторами ВБП в нашем исследовании, но, также и высокой частотой сопутствующей соматической патологии, часто ограничивающей как включение хирургического этапа, так и применение агрессивных химиотерапевтических режимов у больных старшей возрастной группы. При возрастном цензе в 50 лет, достоверных различий в ВБП у больных мРТК в нашей работе не получено.

Удаление первичного очага и/или полная метастазэктомия в комбинации с химиотерапевтическим лечением позволяют преодолеть 5-летнюю отметку ОВ более 50% больных мРТК [71, 217], а медиана времени до прогрессирования превышает, по данным международных исследований лет, двухлетний рубеж (таблица 59). Хирургическое пособие, являющееся эффективной лечебной опцией при условии достижения полной циторедукции, однако, применимо к узкой когорте пациентов, а возможность его включения в план лечения зависит от ряда факторов: локализации первичного очага, распространённости и объема метастатического поражения, симптомности опухоли, ECOG-статуса больного, коморбидного фона и др. В нашем исследовании хирургическое вмешательство выполнено 62 пациентам (44,3%), из них в объеме полной циторедукции – 39 больным (27,9%). В подавляющем большинстве случаев (более 80%, точная оценка затруднена в связи с отсутствием данных) отказ от оперативного пособия

был обусловлен распространенностью и/или объемом вторичного поражения. Пациенты, перенесшие хирургическое лечение в объеме полной циторедукции, характеризовались достоверно лучшим значением медианы времени без прогрессирования (17 мес.). Больные с частичной метастазэктомией и/или удалением только первичного очага не отличались в показателях ВВП от больных с отсутствием оперативного лечения (9 и 10 мес., соответственно).

Таблица 59 - Медиана времени до прогрессирования у больных мРТК, перенесших хирургическое лечение, в зарубежных исследованиях.

Исследование	Медиана времени	
	Хирургическое лечение +	Хирургическое лечение -
Hsu et al., 2011 (mts легкие, III/IV стадии) [104]	16,1 мес.	
Yaeger et al., 2014 (<i>mutBRAF</i> vs <i>wtBRAF</i>) [288]	7,4 мес. vs 10 мес.	
Ustaalioglu et al., 2015 [272]	15,7 мес.	
Parau et al., 2015 (mts печень) [198]	18,0 мес.	
Schirripa et al., 2015 (mts печень) <i>mutRAS</i> vs <i>mutBRAF</i> vs <i>wtRAS/BRAF</i> [238]	11,0 мес. vs 5,7 мес. vs 14,4 мес.	
Guerrera et al., 2016 (mts легкие) [85]	21,0 мес.	
Kim et al., 2017 (mts легкие) [133]	37,0 мес.	
Kim et al., 2017 (mts печень) [133]	28,5 мес.	
Yokoyama et al., 2017 (mts легкие) [296]	20,0 мес.	
Johnson et al., 2018 (<i>mutBRAF</i>) [119]	13,6 мес.	6,2 мес.
Gagniere et al., 2018 (mts печень) (<i>mutBRAF</i> vs <i>wtBRAF</i>) [79]	10 мес. vs 22 мес.	

При одно- и многофакторном анализе полное циторедуктивное хирургическое вмешательство выступило независимым благоприятным прогностическим фактором, достоверно увеличивающим временной интервал до прогрессирования у больных мРТК (HR 0.340, 95% CI 0.196-0.590, $p < 0.001$). Представленные результаты полностью соответствуют данным отечественных и

зарубежных исследований [1, 144, 269, 272].

Несмотря на потенциально радикальный объем, хирургическое лечение у больных мРТК не определяет биологическую эрадикацию опухоли. Рядом исследователей предложены прогностические шкалы оценки риска возврата заболевания после циторедуктивных операций, однако, они учитывают только клинико-морфологические показатели [74, 75, 190, 211, 218]. Открытым и дискуссионным остается вопрос о целесообразности оперативного подхода, даже при условии достижения полной циторедукции, у больных с агрессивным молекулярно-биологическим профилем опухоли [159]. Одной из важных опций, позволяющих проводить селекцию больных для оперативного вмешательства, является поиск опухолевых биомаркеров, которые бы прогнозировали течение заболевания после хирургического этапа. Поскольку в рутинной клинико-лабораторной практике определение статуса генов *RAS* и *BRAF* является стандартом системного лечения больных мРТК, в последние годы активно изучается возможность приложения результатов *RAS/BRAF*-тестирования в контексте дифференциального подхода при определении показаний для хирургического лечения [79, 119, 159, 238, 288].

Учитывая тот факт, что пациенты с патологическим *BRAF*-генотипом характеризуются тенденцией к быстрой диссеминации по брюшине, локо-региональным рецидивам и т.д., частота пациентов с соматическими мутациями в гене *BRAF* среди когорты больных мРТК, перенесших оперативное лечение, почти вдвое ниже по сравнению с пациентами с *mutBRAF*-РТК, леченными медикаментозно (2-4% vs 5-10%, соответственно) [200]. Аналогичная корреляция закономерна и для больных с патологическим *KRAS*-генотипом (30% vs 40%, соответственно) [201, 266]. По результатам нашего исследования доля пациентов с *mutBRAF* и *mutKRAS* среди больных с полной циторедукцией составила 5,1% и 48,7% соответственно. Высокий процент соматических *KRAS*-мутаций, вероятно, обусловлен качественно-количественными характеристиками выборки больных. В целом, частота операбельности среди пациентов с *mutKRAS* составила 29,2% (19/65), для *mutBRAF* – 12,5% (2/16). Представленные данные еще раз

подтверждают крайне негативную прогностическую значимость мутантного *BRAF*-статуса. Средний показатель медианы времени до прогрессирования у больных даже с хирургическим этапом составляет 5,7-13,6 месяцев, медиана ОВ – 22,6-40 месяцев [159], что, однако, незначительно, но превышает аналогичные показатели в группе больных с нерезектабельным статусом [119]. Выполнить анализ ВБП у больных с *mutBRAF* в зависимости от хирургического лечения в нашей работе не представилось возможным в связи с недостаточным числом наблюдений.

Пациенты мРТК с активирующими *KRAS*-мутации после условно радикальных хирургических вмешательств характеризуются также более быстрым возвратом болезни (~ двукратный риск), однако, отличаются от пациентов с патологической *BRAF*-активацией лучшим прогнозом [53, 159, 238]. При этом, показатели ВБП разнятся в зависимости от очага вторичного поражения: так, достоверная разница показана для *KRAS*-ассоциированного поражения легких (62,7% vs 28,1%, $p < 0.001$), в то время как для метастатических очагов в печени статистически значимые результаты не достигнуты (45,3% vs 23,8%, $p = 0.06$) [244]. В нашем исследовании медиана времени без прогрессирования у больных после полной циторедукции с отсутствием соматических мутаций в гене *KRAS* достигла 22-месячной отметки, что достоверно отличалось от аналогичного значения у пациентов с *mutKRAS* (12 месяцев, $p < 0.001$). У больных с отсутствием хирургического этапа, а также с неполной циторедукцией показатели ВБП были сопоставимы в группах независимо от статуса гена *KRAS*.

Пол, стадия заболевания и другие клинико-морфологические отличия не оказали достоверного влияния на ВБП у больных, включенных в данное исследование. Однако, результаты, представленные в других публикациях, демонстрируют, что и указанные признаки могут влиять на медиану времени до прогрессирования и выступать факторами независимого прогноза у пациентов с генерализованным РТК (таблица 60).

Таблица 60 - Независимые факторы прогрессирования заболевания у больных мРТК по результатам зарубежных исследований.

Исследование	Предиктор	HR	p
Кавазое и соавт., 2015 [129]	Таргетная терапия+ПХТ (нет vs да)	2.73	0.009
Гао и соавт., 2017 [83]	Степень дифференцировки (G1 vs G2/3)	2.066	0.048
	TNM (I/II ст. vs III/IV ст.)	2.484	0.000
Shida и соавт., 2018 [243]	Лимфоваскулярная инвазия	3.63	0.004
Liu и соавт., 2018 [152]	Mts (легкие+головной мозг vs печень+др.)	1.481	0.011
	РЭА на момент Ds (<20 vs ≥20)	1.838	0.017
	Таргетная терапия (бевацизумаб)	0.682	0.029

4.2. Молекулярный профиль наследственного рака толстой кишки

СЛ является самым частым наследственным онкологическим синдромом в структуре наследственной патологии опухолей толстой кишки. В преобладающем большинстве случаев (до 90%) природа СЛ обусловлена носительством герминальных мутаций в генах *MLH1* и *MSH2* [17, 43, 267]. При исследовании российской популяции в работе Цуканова А.С. патологический *MLH1/MSH2*-генотип был выявлен у 89,2% больных с СЛ, при этом мутации в гене *MLH1* встречались чаще, чем мутации в гене *MSH2* [5]. В исследовании Rossi и соавт. объединившем клинико-морфологические данные 344 пациентов с СЛ, частота герминальных мутаций в гене *MLH1* составила 54%, в гене *MSH2* – 43% [229]. В нашей работе были также продемонстрированы схожие результаты: мутации в гене *MLH1* диагностированы в 56,6% (n=17), в гене *MSH2* - в 43,4% (n=13) случаев, соответственно. По аналогии с предыдущими исследованиями

герминальные мутации встречались на всем протяжении кодирующей части обоих генов [5]. Отсутствие «горячих» точек обуславливает невозможность диагностики локальных участков указанных генов. Для исключения ложноотрицательных результатов необходимо тестирование всей кодирующей части генов с покрытием сайтов сплайсинга.

В структуре герминальных мутаций доминировали миссенс- и мутации сайта сплайсинга (27,0% и 27,0%, соответственно) для гена *MLH1*, мутации, приводящие к формированию преждевременного стоп-кодона (50%) - для гена *MSH2*, что согласуется с опубликованными ранее данными [5, 61, 229]. Все выявленные мутации в гене *MSH2*, а также шесть мутации в гене *MLH1* зарегистрированы в международных базах данных Ensembl.genome, dbSNP и LOVD как патогенные клинически значимые варианты. В гене *MLH1* для мутаций, не зарегистрированных ранее, функциональная значимость определялась с помощью программ Human Splicing Finder, PolyPhen-2 и др. Так, согласно программы Human Splicing Finder, герминальная мутация 228_233delTTCACT в 3 экзоне гена *MLH1* приводит к изменению сайта энхансера (ESE, Exonic Splicing Enhancer) и нарушению процесса сплайсинга.

Основным критерием для ДНК-генотипирования пациентов на предмет наличия герминальных мутаций в нашем исследовании было соответствие клиничко-анамнестических данных больных пересмотренным рекомендациям Бетезда, точность которых, а также предложенных ранее амстердамских критериев первого и второго издания была оценена для нашей выборки пациентов. Бетездовские рекомендации, позволяющие отбирать пациентов для последующей оценки статуса микросателлитной нестабильности в образцах опухоли и при наличии высокого показателя – поиска герминальных мутаций в генах системы MMR, являются более чувствительными относительно Амстердамских критериев отбора (65% vs 50% согласно данным Vasen и соавт. 2006, Raedle и соавт. 2001 и др [215, 273]). Обладая достаточно высоким показателем специфичности (90% для «Амстердам I») и являясь крайне «строгими», критерии «Амстердам I» «пропустили» 41% наших пациентов с СЛ,

«Амстердам II» - 31%, соответственно.

На сегодняшний день, согласно рекомендациям NCCN и ASCO, определение статуса MSI рекомендуется всем пациентам с РТК с целью исключения СЛ [8, 184]. В нашей работе высокий уровень микросателлитной нестабильности выявлен у 28 пациентов с СЛ с доступными для MSI-тестирования образцами биологического материала, в т.ч. у пациентов с «негативным» семейным анамнезом и при манифестации СЛ в возрасте старше 50 лет. Учитывая тот факт, что кумулятивный риск развития злокачественных новообразований у больных с СЛ на протяжении жизни только возрастает [177], временной возрастной границы для наследственного РТК нет. Изменяются представления о спектре линч-ассоциированных опухолей [239]. В связи с чем, клинические критерии по отбору больных с СЛ значимо уступают в диагностической точности MSI-диагностике. Являясь более экономически оправданным, нетрудоемким и быстрым по срокам исполнения MSI-тестирование позволяет с высокой вероятностью (до 95% по данным разных авторов [196, 215]) не пропустить пациентов с СЛ. Специфичность при этом варьирует в пределах 65%-90% [196, 215]. Допускается применение различных методик для определения MSI-статуса (и ПЦР-диагностика, и ИГХ-тестирование) [184, 185]. Показатель конкордантности двух указанных методов составляет 97,5% и 98,3% по данным исследований Moreira и соавт, и Schwark и соавт. [179, 239]. Дискондантность между данными скрининговыми методиками, регистрируемая в редких клинических случаях, обусловлена различными уровнями изучения функционирования MMR-системы: ПЦР-метод регистрирует следствие процесса репарации неправильно спаренных оснований, т.е. позволяет судить о качестве белковых продуктов, кодируемых MMR-генами, тогда как ИГХ-исследование – метод, детектирующий только количество данных белков, без уточнения их функциональной активности. Особенную значимость данный факт приобретает при герминальных мутациях в генах *MSH6* и *PMS2*, где отсутствие экспрессии при ИГХ-исследовании сочетается со стабильным MSI-статусом, либо приводит к детекции одного нестабильного маркера (MSI-Low).

В нашем исследовании в диагностическую панель для определения статуса микросателлитной нестабильности включены пять высокоинформативных, специфичных и патогномичных однонуклеотидных маркеров для диагностики нарушений в системе репарации неправильно спаренных оснований: BAT25, BAT26, NR21, NR24, NR27. Включение менее точных маркеров, в т.ч. динуклеотидных повторов, бесспорно, повышает вероятность диагностики MSI-High, однако, снижают диагностическую точность в отношении синдрома Линча. Т.е. необходимо различать диагностические цели для MSI-диагностики: исключение синдрома Линча, определение стратегии адьювантного лечения у больных локализованным РТК или определение показаний для иммунотерапии у пациентов с диссеминированным РТК, где расширение диагностической панели является диагностически оправданным. У шести больных с СЛ в нашем исследовании нестабильный MMR-фенотип определен в образцах опухолей других линч-ассоциированных локализаций (РЯ, РТМ, рак мочевого пузыря и рак тонкой кишки), что подтверждает общность патогенетических путей развития злокачественных новообразований эпителиальной природы в составе синдрома Линча. При этом маркеры, обладающие высокой тропностью и успешно детектирующие MSI-High в опухолях толстой кишки, демонстрируют диагностическую эффективность и в опухолях других линч-ассоциированных локализаций.

У двух больных с СЛ стабильный MMR-генотип определен в опухолях молочной железы и предстательной железы. Ввиду того, что данные ЗНО занимают первое и второе ранговые места в структуре онкологической заболеваемости в России у женщин и мужчин, соответственно [3], вопрос о природе РМЖ и рака предстательной железы у пациентов с герминальными MMR-мутациями крайне дискуссионен. По данным литературы, частота детекции MSI-High в опухолях молочной железы, даже у больных с СЛ, колеблется от 0 до 86% [285], в опухолях предстательной железы – до 70% [62, 99]. Учитывая стабильный статус уровень MSI у больных в нашем исследовании, в целом, судить о природе данных нозологий у представленных больных затруднительно, а

молекулярная верификация требует проведения дополнительных молекулярно-генетических исследований. Ряд авторов предлагает расширять скрининговые программы для больных с СЛ, включая РМЖ и рак предстательной железы в потенциальный перечень линч-ассоциированных ЗНО. В среднем, кумулятивный риск РМЖ у женщин-носительниц герминальных MMR-мутаций возрастает в 2-18 раз [100, 285], риск рака предстательной железы у мужчин – в 5 раз [62, 99].

Помимо MSI-статуса всем больным с СЛ в нашем исследовании определялся *BRAF*-статус в образце опухолевой ткани (РТК). Отсутствие соматических мутаций диагностировано у всех пациентов с молекулярно-верифицированным СЛ. Являясь другим специфичным маркером для исключения СЛ у больных РТК [184], тестирование генотипа *BRAF* и в нашей работе показало высокую диагностическую значимость и полную конкордантность с другими исследованиями.

И Амстердамские критерии, и рекомендации Бетезда учитывают наличие родственников с РТК и/или с ЗНО из спектра СЛ, что, принимая во внимание неполную пенетрантность СЛ (до 80% для носителей мутаций в генах *MLH1*, *MSH2*), приводит к гиподиагностике СЛ у пациентов без отягощенного семейного анамнеза, особенно у больных молодого (<25 лет) и старшего возрастов (<60 лет) [246]. В нашем исследовании наличие онкологически отягощенного семейного анамнеза выявлено в 93,3% случаев (n=28/30). Отсутствие пораженных членов родословных отмечено и в других исследованиях, так в работе Kim и соавт. неотягощенный семейный анамнез выявлен у 11,3% больных с СЛ (12/106) [136]. Практически у всех пациентов (96,4%, n=27/28) с семейной историей в нашей работе выявлены случаи ЗНО в первом поколении и лишь у 55,5% из них отмечался РТК с манифестацией заболевания в возрасте до 50 лет. При анализе родословных отмечены различия у пациентов-носителей герминальных мутаций в гене *MLH1* и больных с патологическим *MSH2*-генотипом. РТК доминировал в семейной истории *MLH1*-ассоциированных семей (54,9% случаев), вторым по частоте выступил РТМ (15,7%). *MSH2*-генотип обуславливал более равномерное накопление различных ЗНО и, в отличие от *MLH1*-родословных, характеризовался

высокой частотой РЖ в пораженных семьях (30%). Схожая структура семейного анамнеза получена и в других международных исследованиях. В работе Rossi и соавт. (2017) РТК встречался в 56,4% *MLH1*- и в 48,6% *MSH2*-ассоциированных семей, другие ЗНО из спектра СЛ – в 20,1% и 25% родословных, соответственно [229]. В исследовании Dempsey и соавт. (2014) семейная нагруженность была определена с помощью программ MMRProScore и PREMM, для первой программы данный показатель составил 89.8 (range 0.0–100) и 26.1 (range 5.0–97.6) - для второй [58]. В работе Цуканова А.В. (2017) частота и распределение ЗНО в родословных в зависимости от генотипа сопоставимо с данными, полученными в нашем исследовании, и в целом характеризуют российскую популяцию, где РТК наряду с РТМ и РЖ являются ведущими ЗНО в семейном анамнезе у пациентов с СЛ [5].

Фенотип РТК в составе СЛ является отражением генотипа – нарушениями в системе MMR и, за исключением более молодого возраста манифестации заболевания, закономерно схож с *MSH-High-wtBRAF*-ассоциированным спорадическим РТК (5 подтип по классификации Jass (2007)) [118]. В нашем исследовании пациенты с синдромом Линча достоверно раньше заболевали РТК (40,5 лет vs 65,1 лет в контрольной группе ($p < 0.001$)) с преобладающим поражением правых отделов толстой кишки ($p = 0.005$) без различий по полу (53,4% женщин и 46,6% мужчин). Все выявленные клинические характеристики соответствуют описанным ранее проявлениям СЛ. Так, в работе Pérez-Cabornero и соавт. [206] у 80% пациентов с СЛ РТК был диагностирован в возрасте до 50 лет и в 90% случаев локализовался в правых отделах толстой кишки. В исследовании Kim и соавт. (2016) с сопоставимой частотой СЛ встречался у мужчин и женщин (52,8% vs 47,2%), в 69,8% случаев также диагностировалось правостороннее поражение [136]. В исследовании Goecke и соавт. [86] средний возраст манифестации РТК составил 41 год и 44 года для носителей *MLH1* и *MSH2*-мутаций, соответственно, при этом патологический *MLH1*-фенотип обуславливал более раннее развитие заболевания. Аналогичные данные получены и в нашей работе - у всех пациентов с *MLH1*-мутациями РТК был диагностирован в возрасте

до 50 лет (среднее значение составило 39,8 лет). У больных с герминальными мутациями в гене *MSH2* РТК манифестировал в возрасте до 40 лет только в 33,3% случаев, у трех пациентов - после достижения 50-летнего возраста.

Высокий статус микросателлитной нестабильности определяет морфологические черты РТК в составе СЛ: увеличение числа низкодифференцированных опухолей и редких гистологических вариантов, наличие муцинозного компонента и лимфоплазмоцитарной инфильтрации, что показано в нашем исследовании и продемонстрировано в других работах [82, 118, 136, 208].

СЛ ассоциирован с высокой вероятностью развития первично-множественных злокачественных новообразований, и в первую очередь – вторых первичных опухолей толстой кишки. В работе Parry и соавт. (2011) кумулятивный риск развития метахронного РТК составил 16% к 10 годам и 62% к 30 годам наблюдения после выполнения органосохранных операций на толстой кишке [199]. В другом исследовании кумулятивный риск последующего РТК после выполнения аналогичных операций составил 8,4% на отметке 5 лет и 20,4% к 10 годам наблюдения [136]. В нашей работе у 15 пациентов (50,0%) РТК был диагностирован в составе Линч-ассоциированных ПМЗН. Самым частым вторым первичным ЗНО был синхронный или метахронный РТК (выявлен в 26,3% случаев). Вторыми ПМЗН по частоте развития отмечены рак тонкой кишки (11,9%), РТМ (11,9%) и РМЖ (11,9%) у женщин. Высокий риск развития РТМ у женщин с СЛ (21,6%) показан и в другом российском исследовании [4].

Несмотря на то, что риск РЖ на фоне СЛ превышает таковой для опухолей тонкой кишки (13% vs 6%) [184] и в ряде исследований является третьим по частоте ЗНО в составе СЛ после РТК и РТМ [86], в нашей работе был получен высокий процент первичного рака тонкой кишки, что подчеркивает важность динамического эндоскопического исследования верхних отделов ЖКТ у пациентов с СЛ. По аналогии с исследованием Goecke и соавт. (2006) в нашем исследовании спектр ПМЗН был намного шире в группе *MSH2*-ассоциированного СЛ в сравнении с носителями *MLH1*-мутаций [86]. При этом опухоли

мочевыделительной системы (рак почки, мочеточников и мочевого пузыря) отмечены только у больных-носителей герминальных *MSH2*-мутаций. Данный факт обусловлен более высоким риском развития ЗНО указанных локализаций именно у пациентов с *MSH2*-патологическим генотипом [121], что в свою очередь обосновывает более поздний возраст манифестации данных опухолей у больных (после 60 лет у всех больных с СЛ с указанными ЗНО в нашей выборке больных). Данная закономерность также должна приниматься во внимание специалистами при планировании программы скринингового наблюдения пациентов с *MSH2*-ассоциированным СЛ.

Спектр ЗНО, ассоциированных с СЛ, продолжает расширяться. Так, в исследовании Schwark и соавт. представлены данные о соматическом и герминальном профилях более 15 000 образцов опухолей различной локализации. Результаты работы продемонстрировали, что почти половина злокачественных новообразований с высоким уровнем микросателлитной нестабильности и герминальными мутациями в генах системы MMR являлись ни РТК, ни РТМ, а были представлены широким перечнем ЗНО, в т.ч. опухолями не из спектра СЛ, среди них – мягкотканые саркомы, мезотелиомы, герминогенные опухоли, меланома, опухоли ЦНС и др. [239]. В нашем исследовании СЛ манифестировал с РТК у мужчин в 86% (n=12/14) и у женщин в 66,7% (n=11/16) случаев, соответственно. При этом у мужчин оба пациента (один с РЖ, другой с первичным очагом в тонкой кишке) являлись носителями герминальных мутаций в гене *MSH2*. Выявить аналогичной закономерности у женщин не удалось.

Несмотря на быструю опухолевую прогрессию (время эволюции аденомы в рак) у пациентов с высоким уровнем микросателлитной нестабильности, больные с СЛ характеризуются лучшим прогнозом и показателями выживаемости по сравнению с пациентами со стабильной системой репарации MMR [157]. В нашем исследовании Линч-ассоциированный РТК достоверно реже диагностировался на IV стадии заболевания (p=0.028). В работе Kim и соавт. (2016) ни один больной с СЛ на момент постановки диагноза не был диагностирован с IV стадией заболевания, а 15-летняя ОВ пациентов с СЛ превысила 80% (83,3%) [136]. В

другом исследовании Phipps и соавт. (2015) лишь один пациент из группы СЛ-ассоциированного РТК имел отдаленные метастазы (1/50), а показатель ОВ был лучшим в сравнении с другими молекулярными подтипами РТК [208]. В 2017 г. опубликованы проспективные данные наблюдения за пациентами с СЛ, аккумуляровавшим 1 273 больных из 10 европейских стран в коллаборации с Mallorca group [177]. 10-летняя ОВ больных с СЛ составила 82%, 10-летняя выживаемость после манифестации РТК – 91%. При этом выявлены различия в продолжительности жизни больных в зависимости от генотипа. Пациенты-носители *MSH2*-мутаций характеризовались лучшим показателем ОВ в отличие от больных с *MLH1*-мутациями (84% vs 80%). В нашей работе мы также оценили ОВ и опухоль-специфическую выживаемость больных с СЛ в зависимости от *MLH1/MSH2*-генотипа. Медиана наблюдения достигнута только для больных с *MLH1*-ассоциированным РТК и составила 158 мес. (13 лет и 2 мес.) По аналогии с предыдущим исследованием в нашей работе носители *MLH1*-патологического генотипа статистически незначимо уступали и в ОВ ($p=0.383$), и в опухоль-специфической выживаемости ($p=0.072$) больным с *MSH2*-герминальными мутациями. 10-летний показатель ОВ достиг значения 90% и 87,5%, DSS – 88,9% и 100% для *MLH1* и *MSH2*-генотипов, соответственно. На рисунке 51 представлен катамнез пациентов с СЛ, одного из немногих наследственных онкологических синдромов с самыми высокими показателями выживаемости, несмотря на 27-летний, 34-летний и 19-летний онкологический анамнез в представленных случаях.

Пациент Ш.	Пациентка Ш.	Пациент Р.
47 лет – РТК	34 года – РМЖ	52 года – РТКК
52 года – РТКК	35 лет – РТК	54 года – РТК
55 лет – меланома кожи	56 лет – РТМ	55 лет – РТК
67 лет – РТКК	64 года – РЩЖ	60 лет – РМочет
71 год – РТК	66 лет – РП	65 лет – РПредЖ
72 года – РПоджЖ	68 лет – РМЖ	70 лет – РМочет
74 года – РМочП		71 год – Рак кожи

Рисунок 53 – Клинический анамнез пациентов с СЛ, включенных в исследование.

При своевременной диагностике пациенты с *wtBRAF*-РТК и высоким уровнем микросателлитной нестабильности относятся к самой прогностически благоприятной группе РТК и характеризуются наименьшей вероятностью прогрессирования/рецидива заболевания (HR 0.48 95%CI 0,33-0,70, p=0.0001) [86, 208]. В случае возврата болезни, MSI-High-статус опухоли является одним из негативных предикторов общей выживаемости, уступая лишь *BRAF*-ассоциированному РТК (HR 1.6 95%CI 1,07-2,41, p=0.02) [86]. В нашей выборке больных у двух пациентов РТК был диагностирован на IV стадии: одна больная погибла через 15 месяцев после диагностирования заболевания, у другого больного – через 12 месяцев с момента начала системной терапии констатирован химиорезистентный РТК, пациент находится на иммунотерапии ниволумабом. У двух больных с СЛ отмечено прогрессирование болезни после окончания специфического лечения: через 6 и 12 месяцев, летальный исход – в течение полугода и года, соответственно. И пациенты с IV стадией заболевания, и больные с возвратом болезни являлись носителями герминальных мутаций в гене *MLH1*. Возможным объяснением данного феномена может являться тот факт, что ген *MLH1* является необходимым звеном в поддержании стабильности и надлежащего функционирования комплекса MutL α (*MLH1*-*PMS2*) у эукариот в процессе репарации неправильно спаренных оснований. Подавление экспрессии гена *MLH1*, приводит к нарушению нормального функционирования всей MMR-системы, в то время как функциональная активность других MMR-звеньев может быть в определенной степени компенсирована [151, 235].

Выживаемость больных с СЛ также коррелирует с видом диагностируемой мутации. Пациенты-носители вариантов, приводящих к формированию преждевременного стоп-кодона, протяженных инсерций и делеций, достоверно уступают в ОВ больным с миссенс- и мутациями сайта-сплайсинга (медиана ОВ 132,46 vs 82,55 месяцев, HR 0.46 95%CI:0.16-0.82 p=0.0153) [157]. В исследовании Massaroni и соавт. наихудший показатель ОВ наблюдался в группе пациентов с нонсенс- и мутациями, приводящим к сдвигу рамки считывания (медиана выживаемости 77,31 месяца), наилучший – для больных-носителей

сплайс-мутаций и миссенс-вариантов (медиана - 150,46 месяцев и 132,46 месяцев, соответственно). Выявленные различия достигли статистической значимости ($p=0.0224$) [157]. В нашей работе больные с различными вариантами мутаций достоверно не различались в показателе ОВ.

Для пациентов с подозрением на САП в нашем исследовании выполнено молекулярно-генетическое исследование с целью оценки строения кодирующей части и сайтов сплайсинга гена *APC*. Герминальные патогенные клинически значимые мутации были выявлены в 61,5 % случаев (16/26), что уступает частоте мутаций, выявленной в другом российском исследовании, где данный показатель достиг значения 72,2% (78/108) [5]. Ряд европейских исследований также продемонстрировал высокий уровень мутаций у пациентов с формально-генетическим диагнозом САП (75% в работе Papp и соавт. (2016), 59% в исследовании Plawski и соавт. 2008) [197, 209]. По данным крупного межцентрового исследования, объединившего 8 903 пациента с полипозным поражением толстой кишки, патологический *APC*-генотип был выявлен в 68% случаев среди европейцев, однако частотный показатель зависел от степени проявления полипоза: при наличии не более 1000 полипов, герминальные *APC* мутации выявлены у 55% больных [92], что соответствует полученным нами данным, учитывая степень полипоза в нашей выборке больных (не более 1 000 полипов).

Спектр мутаций в гене *APC*, выявленных в нашем исследовании, отличается от представленных ранее данных. В исследовании клиники Mayo доминировали мутации со сдвигом рамки считывания и нонсенс-мутации (43% и 42%, соответственно), в 9% случаев диагностировали мутации сайта-сплайсинга [130]. При изучении российской популяции также получены схожие данные. В работе Yanus и соавт. мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания, наблюдались в 50% случаев, формирование преждевременного стоп-кодона у 35% больных и в 10% случаев встречались мутации сайта-сплайсинга [292]. Для наших больных с САП доминирующими выступили непротяженные делеции и инсерции (71,4% случаев). Нонсенс-мутации значительно уступили в числе таковым в

вышеуказанных источниках, возможным объяснением является малочисленность нашей выборки больных.

Средний возраст манифестации РТК на фоне САП для больных в нашем исследовании составил 41,6 лет, что несколько превышает данные ряда исследователей: в работе Grover и соавт. – 30 лет (максимальный возраст манифестации – 41 год), в исследовании Цуканова А.С., 2017 - 31,8 лет (максимально - 44 года) [5, 92, 292], однако, учитывая высокую клинико-генетическую гетерогенность САП, полученные результаты не противоречат возрастным интервалам реализации генотипа при САП (в работе Yanus и соавт. данный показатель достиг значения - 37 лет [292]). В нашей работе у двух больных РТК диагностирован после 50 лет, самый ранний возраст проявления болезни составил 13 лет, что также указывает на широкий временной диапазон манифестации РТК при САП.

САП характеризуется высоким риском развития вторых первичных опухолей толстой кишки при органосохранных операциях у пациентов с распространенным полипозным поражением [184]. Так, в исследовании Yamaguchi и соавт. рак прямой кишки после выполнения тотальной колэктомии с формированием илеоректального анастомоза был выявлен у 30% больных с САП при медиане наблюдения 8,9 лет [290]. В нашей работе у 3 больных выявлены синхронные и у 2 пациентов – метакронные злокачественные опухоли толстой кишки (время до манифестации второго ЗНО составило 1 год и 3 года, соответственно). РЦЖ, встречающийся с частотой от 7 до 38% при САП по данным разных исследователей [70, 102, 184], диагностирован в нашей работе у одной больной в возрасте 18 лет, при этом отмечен наиболее частый папиллярный гистологический вариант опухоли [70, 102]. У двух больных диагностирован синдром Гарднера: сочетание полипозного поражения толстой кишки с остеомой верхней челюсти в одном случае и фиброматозом передней грудной стенки в другом. Во втором случае отмечено характерное для синдрома расположение герминальной мутации – в 1465 кодоне, что описано ранее другими авторами [24, 187].

Опухоли с патологическим *APC*-генотипом часто сочетаются с соматическими мутациями в гене *KRAS*. В работе Samowitz и соавт. данная корреляция отмечена в 40% случаев [236]. В нашем исследовании только 6 пациентам с САП выполнено *KRAS*-тестирование, соматические мутации выявлены у всех больных, при этом у четверых больных на момент постановки диагноза выявлены очаги отдаленного метастазирования.

САП один из наследственных синдромов с высокой частотой мутаций *de novo* – $4-9 \cdot 10^{-6}$ мутаций на одно поколение по данным Riga и соавт. [10, 184, 221]. При этом в подавляющем большинстве случаев природа патологического генотипа ассоциирована с изменениями в отцовских гаметах [10, 221]. Так в работе, Aretz и соавт. из 16 случаев мутаций *de novo* – у 12 больных изменения в гене *APC* имели отцовское происхождение [10]. В нашем исследовании у 2 больных (15,4%) не выявлено отягощенного семейного анамнеза. У пациентов с онкологической нагрузкой только у 70% больных отмечено наличие родственных ПСР с РТК, несмотря на высокую (практически 100%) пенетрантность САП.

Двадцать одному пациенту в нашем исследовании молекулярно-генетическая диагностика выполнена с помощью технологии секвенирования нового поколения. Нам удалось достичь оптимальных показателей экзонного покрытия для герминального генома – в среднем 38 прочтений. Таргетная панель, включившая основные 15 генов, ответственных за развитие нРТК, показала в нашем исследовании высокую эффективность: у 10 пациентов диагностированы герминальные патогенные мутации, в последующем подтвержденные секвенированием по Сэнгеру.

В общей структуре диагностированных вариантов, на долю вариантов с неизвестным клиническим значением пришлось 24%, что в целом характеризует среднее число VUS в аналогичных исследованиях [57, 227], при этом данная категория является одной из самых противоречивых и неоднозначных при интерпретации результатов NGS, наряду с определением у пациентов мутаций в «генах-сателлитах», т.е. позиционирующихся исходно, как гены, не вовлеченные в этиологию заболевания у больного. В нашей работе гетерозиготное носительство

двух патогенных мутаций выявлено у трех больных. В первом случае больная САП с герминальной нонсенс-мутацией в гене *APC* являлась носителем значимого варианта в гене *CHEK2*, гена-кандидата для семейного колоректального рака типа X, варианта неполипозного рака толстой кишки. Ведущим объяснением данного сочетания (*mutAPC+mutCHEK2*) является достаточно высокий частотный показатель гетерозиготного носительства минорной аллели С в популяции (MAF>0.01) для варианта p.I157T. Помимо риска развития РТК данная мутация описана как вариант средне-низкой пенетрантности для РМЖ у женщин [181], в связи с чем, пациентке даны соответствующие рекомендации по диспансерному наблюдению.

В двух случаях с применением вспомогательных биоинформатических программ показана вероятная патогенность выявленных вариантов, однако, истинное влияние данных мутаций на белковый продукт и его функциональную активность возможно определить только с помощью последующих молекулярно-биологических исследований. В нашем исследовании у одной больной с молекулярно-верифицированным синдромом Линча, помимо патогенной мутации в гене *MSH2*, диагностирована гетерозиготная герминальная мутация с.451G>A (p.Ala151Thr, rs201103359) в гене *MUTYH*. Учитывая факты, что истинный *MUTYH*-ассоциированный полипоз обусловлен биаллельной инактивацией данного гена и что на момент постановки диагноза РТК у 46-летней больной не выявлено ни одного дополнительного образования (полипа, аденомы) на всем протяжении толстой кишки, судить о роли данного варианта в реализации заболевания у данной больной возможно только после оценки функционального состояния белка, кодируемого геном *MUTYH*.

Миссенс-мутация с.1771G>A (p.Ala592Ser, rs35187787) в гене *CDH1*, также в гетерозиготном состоянии, определена у пациентки семейным аденоматозным полипозом. Ген *CDH1*, кодирующий белок кадгерин E, является этиологическим фактором развития наследственного диффузного рака желудка, являющегося крайне редкой наследственной патологией. Опухоли толстой кишки в составе данной синдромальной патологии не описаны, однако, соматическая инактивация

и потеря экспрессии E-кадгерина при колоректальном раке ассоциирована с поражением лимфатического коллектора и инфильтративным опухолевым ростом [135]. Учитывая данный факт, в приложении к нашему клиническому случаю, наличие герминального дефекта в гене *CDH1* может усугублять течение APC-ассоциированного РТК, способствуя более быстрой потере адгезивных свойств опухолевыми клетками, эпителиально-мезенхимальному переходу и генерализации заболевания. Однако, по аналогии с предыдущим случаем сочетания разных мутаций, только после проведения дополнительных исследований возможно оценить истинную патогенность диагностированного *CDH1*-варианта.

Мультигенное кастомизированное тестирование, направленное на поиск не только однонуклеотидных замен, а также изменений числа копий (copy number variation, CNV), протяженных инсерций и делеций, является важным молекулярно-генетическим подходом при нРТК, особенно в случае фенотипического перекреста, когда диагностика «ген за геном» не позволяет добиться удовлетворительного результата. Целевой группой пациентов с нРТК для NGS-диагностики являются больные с отрицательным результатом первичного скрининга на наличие СЛ или САП. В нашей работе высокая частота выявленных патогенных вариантов обусловлена включением пациентов с формально-генетическим диагнозом СЛ и САП без предварительного ДНК-тестирования. Другим ограничением нашего исследования является поиск только SNP и непротяженных инсерций и делеций.

Одним из важных приложений NGS при нРТК является определение уровня мутационной нагрузки, являющегося потенциальным маркером дефицита в системе MMR-генов. В работе Stadler и соавт. оценка уровня микросателлитной нестабильности в 224 образцах опухолевой ткани рака толстой кишки выполнена параллельно с таргетным секвенированием с применением 341-генной панели [254]. Менее 20 мутаций в образце характеризовало РТК с MSS. Среди опухолей с более чем 20 мутациями, 90% являлись микросателлитно-нестабильными. Все ультрамутированные образцы РТК «несли» *POLE*-мутации и были,

соответственно, микросателлитно-стабильными. Интервальное значение 20-150 вариантов определено авторами как «окно» мутационной нагрузки для опухолей с нарушениями в системе MMR и, в случае выполнения данного исследования больным РТК, может служить диагностическим инструментом при отборе больных на последующее ДНК-генотипирование для подтверждения/исключения СЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные возможности молекулярно-генетической диагностики позволяют расширять представления о молекулярной природе онкологической патологии, а высокая гетерогенность ЗНО, в т.ч. и РТК, обуславливает необходимость стратификации данных заболеваний с целью оптимизации как диагностических, так и лечебных подходов. На сегодняшний день предложено несколько молекулярных классификаций РТК, однако, как научный, так и клинический интерес к данной проблеме приводит к постоянному росту научных исследований в этой области. Несмотря на открытие новых молекулярных маркеров, фундаментальные критерии стратификации РТК остаются по-прежнему ведущими при отнесении опухоли толстой кишки к той или иной молекулярной группе.

Понимание молекулярного патогенеза является залогом успешного лечения, особенно в группе больных генерализованным РТК, и наряду с оценкой признанных факторов прогноза (возраст, ECOG-статус и др.) является одним из важных инструментов при определении стратегии лечения больных мРТК.

Отдельной группой пациентов являются больные наследственно-обусловленным колоректальным раком, где постановка генетического диагноза определяет план диагностических, лечебных и профилактических мероприятий, как у пациентов, так и здоровых членов семьи.

Целью нашего исследования был анализ молекулярно-генетических особенностей наследственных форм РТК и спорадического генерализованного колоректального рака и оценка их прогностического значения. В исследование включены 365 пациентов с морфологически верифицированным диагнозом РТК, которые проходили обследование и/или находились на лечении в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 1972 по 2018 гг. Для достижения цели исследования сформирована статистическая база данных. Все пациенты стратифицированы на две исследовательские группы. В первую спорадическую группу включены 140 больных генерализованным РТК. Вторая герминальная группа объединила 143 пациента с формально-генетическим

диагнозом наследственного рака толстой кишки в составе синдрома Линча или семейного аденоматозного полипоза. Для последующего клинко-морфологического сравнительного анализа была сформирована неотобранная контрольная группа больных РТК, включившая 82 больных с верифицированным диагнозом колоректального рака. Для реализации поставленных задач для группы спорадического РТК выполнено ДНК-тестирование соматических мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* и оценен статус микросателлитной нестабильности – основных молекулярных маркеров, имеющих клиническое приложение и рекомендованных для ДНК-диагностики в группе больных диссеминированным РТК. В нашей стране нами впервые оценены частотный профиль генов *RAS/BRAF* и статус MSI в образцах опухоли больных мРТК, выполнен последующий «генотип-фенотип» анализ с оценкой прогностической значимости выявленных изменений.

Закономерно диагностированная высокая частота соматических мутаций в генах MAPK-киназного пути (*mutKRAS* 46,4%, *mutNRAS* 8,6%, *mutBRAF* 11,4%) подтверждает значимость патологической *RAS/BRAF*-активации в опухолевой прогрессии. Выявленные клинко-морфологические различия, ассоциированные с мутантным статусом *RAS/BRAF*, являются отражением патогенетической природы РТК проксимальной и дистальной локализаций, где различные механизмы реализации геномной нестабильности приводят к фенотипическим отличиям опухолей толстой кишки. Так, патологический *RAS*-генотип был ассоциирован с левосторонним поражением толстой кишки, морфологически преобладанием умереннодифференцированной аденокарциномы, диагностированием заболевания только на III и IV стадиях заболевания при соматических *NRAS*-мутациях, с сопоставимой частотой диагностировался у мужчин и женщин. В то время как *BRAF*-ассоциированный РТК характеризовался более частой манифестацией у женщин, достоверным преобладанием правостороннего поражения толстой кишки, высокой частотой опухолей низкой степени дифференцировки с муцинозным компонентом, превалированием IV стадии на момент постановки диагноза.

При анализе статуса микросателлитной нестабильности в образцах опухолевой ткани стабильный показатель (MSS) выявлен у 108 (77,1%) больных, MSI-Low – у 5 (3,6%) пациентов и MSI-High у 15 (10,7%) больных. При оценке клинико-морфологических особенностей пациенты с MSI-High-РТК приближались по своим характеристикам к больным *BRAF*-ассоциированным РТК и характеризовались большей частотой встречаемости среди женщин, высоким процентом поражения правых отделов толстой кишки, гистологически более вариабельной картиной со статистически значимым доминированием опухолей низкой степени дифференцировки. В то время как колоректальный рак с интактной системой репарации неправильно спаренных оснований или низким уровнем микросателлитной нестабильности демонстрировал черты хромосомно-нестабильного *RAS*-ассоциированного РТК.

В нашем исследовании показано независимое негативное прогностическое влияние соматических мутаций в генах *KRAS* и *BRAF* на медиану времени до прогрессирования у больных генерализованным РТК. Высокий уровень микросателлитной нестабильности, являющийся фактором благоприятного прогноза у пациентов с локализованным РТК и неблагоприятного исхода у больных диссеминированным РТК, также подтвердил свое негативное прогностическое влияние и в нашей работе. При комплексном анализе, больные с отсутствием соматических *RAS/BRAF* мутаций и стабильной системой репарации характеризовались достоверно лучшими результатами выживаемости. При этом самым прогностически неблагоприятным молекулярным подтипом выступил *BRAF*-ассоциированный РТК со стабильной системой репарации неправильно спаренных оснований.

Среди клинических предикторов в нашей работе хирургическое лечение в объеме полной циторедукции выступило независимым благоприятным фактором прогноза у больных генерализованным РТК. При этом, достижение максимального положительного эффекта отмечено у пациентов с отсутствием активирующих соматических мутаций в генах *RAS/BRAF*. Медиана времени до прогрессирования достигла максимального значения – 22 месяца у больных с

«диким типом» гена *KRAS*, что почти двукратно превышает аналогичный показатель в группе больных и с *KRAS*-ассоциированным колоректальным раком (12 месяцев).

Будущий прогресс в лечении больных мРТК безусловно связан с разработкой новых препаратов для молекулярно-направленной терапии, в т.ч. для ингибирования *RAS*- активности, наряду с внедрением новых препаратов для уже известных мишеней – *mutBRAF*, *mutPIK3CA*, амплификации *HER2* и *MSI*. Изучение различных молекулярных механизмов резистентности к анти-EGFR-терапии у больных *wtRAS/BRAF* и поиск путей их преодоления также являются важными задачами научных и клинических исследований.

Для группы наследственного РТК в данном исследовании выполнен поиск герминальных мутаций в генах *MLH1/MSH2* и *APC*, ответственных за развитие СЛ и САП, соответственно. Частота и вид выявленных мутаций, их распределение среди пациентов, корреляция с клиническими и анамнестическими данными в нашем исследовании согласовывались с представленными ранее данными, в т.ч. для российской выборки больных нРТК.

В группе больных РТК на фоне множественного полипоза толстой кишки (>20 полипов) в 61,5% случаев колоректальный рак являлся ассоциированным с герминальными мутациями в гене *APC*.

При клиническом соответствии пациентов с неполипозным вариантом нРТК рекомендациям Бетезда II, выступившими критериями включения в данное исследование, частота носительства герминальных мутаций в генах *MLH1* и *MSH2* составила 25,6%. При этом, клинические критерии отбора значимо уступили в показателях точности молекулярным маркерам синдрома Линча. Диагностическая точность критериев «Амстердам I» и «Амстердам II» при клиническом отборе больных для последующей ДНК-диагностики составила 85% и 75%, соответственно. MSI-тестирование как скрининговое исследование для больных с СЛ несомненно остается ведущим высокочувствительным методом, подтвердившим свою высокую диагностическую эффективность и в нашем исследовании. При ДНК-генотипировании отсутствие «горячих» точек в генах

MLH1/MSH2 подтвердило необходимость тестирования всей кодирующей части обоих генов с сайтами сплайсинга.

При оценке клинико-морфологических характеристик пациенты с синдромом Линча достоверно раньше заболевали РТК. С сопоставимой частотой СЛ диагностировался у мужчин и женщин. Линч-ассоциированные опухоли достоверно чаще локализовались в правых отделах толстой кишки и были представлены морфологически аденокарциномами кишечного типа различной степени дифференцировки. РТК в составе СЛ достоверно реже диагностировался на IV стадии заболевания. В структуре ПМЗН самой частой второй первичной опухолью являлся синхронный или метасинхронный РТК. При этом носительство герминальных *MSH2*-мутаций ассоциировалось с более широким спектром первичных линч-ассоциированных ЗНО, а также бóльшим риском развития ЗНО мочевыделительной системы, подтверждая важность персонализированного подхода к определению стратегии наблюдения больных с СЛ с учетом генотипических особенностей.

Нами впервые оценены показатели общей выживаемости больных с СЛ, а также опухоль-специфической выживаемости пациентов с РТК в составе СЛ в зависимости от MMR-генотипа. Показатель 10-летней ОВ больных СЛ составил 90,0% и 87,5% для патологических *MLH1*- и *MSH2*-генотипов, соответственно. При оценке опухоль-специфической выживаемости больные с *MSH2*-ассоциированным РТК характеризовались лучшей выживаемостью и прогнозом в сравнении с больными-носителями герминальных мутаций в гене *MLH1*.

Для молекулярно-генетической диагностики герминальных мутаций в генах, участвующих в канцерогенезе ЗНО ЖКТ, нами разработана диагностическая панель для таргетного пиросеквенирования на платформе 454 Roche Junior, включившая 15 генов-кандидатов. Показана высокая эффективность и конкордантность технологий секвенирования нового поколения со стандартными методиками. Герминальные патогенные клинически значимые мутации выявлены у 9 из 21 пациентов (45%), включенных в протокол исследования методом NGS. В общей структуре клинически значимые мутации составили 20% от числа всех

выявленных вариантов, варианты с неизвестным клиническим значением (VUS) – 24%. Все диагностированные варианты подтверждены секвенированием по Сэнгеру.

Выполненный комплексный молекулярно-генетический анализ особенностей наследственного колоректального рака направлен на повышение эффективности медико-генетического консультирования пациентов и их семей, оптимизирование лечения больных, в т.ч. диагностических и профилактических мероприятий с целью своевременного выявления и лечения вторых первичных опухолей у пациентов с синдромальной патологией

ВЫВОДЫ

1. Пациенты с генерализованным раком толстой кишки характеризуются высокой частотой соматических мутаций в генах *RAS/BRAF* (55% и 11,4%, соответственно) и низкой частотой опухолей с нестабильной системой репарации неправильно спаренных оснований (10,7%);
2. Колоректальный рак с мутантным *BRAF*-статусом и/или высоким уровнем микросателлитной нестабильности достоверно чаще представлен опухолями низкой степени дифференцировки (37,4% и 60,0%, соответственно);
3. Независимыми факторами прогноза, определяющими достоверно худшую выживаемость без прогрессирования, у больных генерализованным раком толстой кишки являются патологический *KRAS* и *BRAF*-генотипы (HR 2.149, $p=0.005$ и HR 4.100, $p=0.001$, соответственно), а также высокий уровень микросателлитной нестабильности (HR 2.481, $p=0.008$);
4. В группе больных раком толстой кишки со стабильным MMR-статусом самым прогностически неблагоприятным молекулярным подтипом является *BRAF*-ассоциированный РТК;
5. Хирургическое лечение в объеме полной циторедукции выступает независимым благоприятным фактором прогноза у больных генерализованным колоректальным раком (HR 0.34, $p<0.001$) с достижением максимального положительного эффекта у пациентов с отсутствием активирующих соматических мутаций в генах *RAS/BRAF*;
6. При клиническом соответствии рекомендациям Бетезда II, частота носительства герминальных мутаций в генах *MLH1* и *MSH2* у больных раком толстой кишки составляет 25,6%;
7. Диагностическая точность критериев «Амстердам I» и «Амстердам II» при клиническом отборе больных для последующей ДНК-диагностики при синдроме Линча составляет 85% и 75%, соответственно;
8. Рак толстой кишки на фоне множественного полипоза толстой кишки (>20 полипов) в 61,5% случаев ассоциирован с герминальными мутациями в гене *APC*;

9. Пациенты с герминальными мутациями в гене *MSH2* характеризуются более широким спектром первично-множественных злокачественных новообразований и более высоким риском развития опухолей мочевыделительной системы в сравнении с больными-носителями герминальных мутаций в гене *MLH1*;

10. Патологический *MSH2*-генотип определяет лучшую 10-летнюю опухоль-специфическую выживаемость больных раком толстой кишки в составе синдрома Линча по сравнению с больными-носителями герминальных мутаций в гене *MLH1* (100% и 88,9%, соответственно).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСАП – аттенуированная форма семейного аденоматозного полипоза

АК - аденокарцинома

АФП – альфа-фета протеин

ВГЭПС - врожденная гипертрофия пигментного эпителия сетчатки

ВБП – выживаемость без прогрессирования

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ВСР – вторая степень родства

ГН – геномная нестабильность

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЗНО – злокачественное новообразование

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИГХ - иммуногистохимия

КТ – компьютерная томография

МАК – медуллярная аденокарцинома

МГК – медико-генетическое консультирование

МРТ – магнитно-резонансная томография

мРТК – метастатический РТК

ННКРР – наследственный неполипозный колоректальный рак

нРТК – наследственный рак толстой кишки

НЭР – нейроэндокринный рак

ОАФ – опухоль, ассоциированные фибробласты

ОВ – общая выживаемость

ОГМ – опухоль головного мозга

ПКР – перстневидно-клеточный рак

ПСР – первая степень родства

ПМЗН – первично-множественные злокачественные новообразования

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РЖ – рак желудка

РЖелчП – рак желчного пузыря

РЛ – рак легких

РМЖ – рак молочной железы

РМоч – рак мочетоника

РМочП – рак мочевого пузыря

РНК – рибонуклеиновая кислота

РП – рак почки

РподжЖ – рак поджелудочной железы

РпредЖ – рак предстательной железы

РТК – рак толстой кишки

РТМ – рак тела матки

РТКК – рак тонкой кишки

РЩЖ – рак щитовидной железы

РЯ – рак яичников

САП - семейный аденоматозный полипоз

СЛ – синдром Линча

сРТК – спорадический рак толстой кишки

ТА – тубулярная аденома

ТКИ – ингибиторы тирозинкиназ

ТСР – третья степень родства

УЗИ – ультразвуковое исследование

УЗКТ – ультразвуковая компьютерная томография

ФАК – фокусы аномальных крипт

ЦНС – центральная нервная система

ЦР - циторедукция

ЭГДС - эзофагогастродуоденоскопия

ЭИ – эндоскопическое исследование

ASCO – American society of clinical oncology (Американское общество клинических онкологов)

CI – confidence interval (доверительный интервал);

CIN – chromosomal instability (хромосомная нестабильность)

CIMP – CpG island methylator phenotype (фенотип, ассоциированный с метилированием CpG-островков)

CNV – copy number variation (изменение числа копий гена)

CMMRD - constitutional (biallelic) mismatch repair deficiency syndrome (синдром конститутивного дефицита в системе репарации (синдром биаллельной инактивации генов системы репарации неправильно спаренных оснований))

CMS – consensus molecular subtypes (консенсусные молекулярные подтипы)

CSGE – conformation sensitive gel electrophoresis (конформационно-чувствительный гель-электрофорез)

dbSNP – database of Single Nucleotide Polymorphisms (база данных однонуклеотидных полиморфизмов)

De novo – герминальная мутация у пациента, впервые возникшая в семье

DSS – disease-specific survival (опухоль-специфическая выживаемость)

ESHG – the European Society of Human Genetics (Европейское общество по изучению генетики человека)

FDA – food and drug administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов)

HGMD - the Human Gene Mutation Database (база данных мутаций в геноме человека)

HP – hyperplastic polyp (гиперпластический полип)

HR – hazard ratio (отношение рисков)

HRM – high resolution melting (плавление высокого разрешения)

IARC – International Agency for Research on Cancer (Международное агентство по изучению рака)

In vitro – в искусственных условиях

In vivo - в живом организме

LOH – loss of heterozygosity (потеря гетерозиготности)

MMR – DNA mismatch repair (система репарации неправильно спаренных оснований)

MSI – microsatellite instability (микросателлитная нестабильность)

MSS – microsatellite stable (отсутствие микросателлитной нестабильности)

mts - метастаз

NCCN – National cancer comprehensive network (Национальная всеобщая онкологическая сеть)

NCI – National cancer institute (Национальный раковый институт, США)

NGS – next generation sequencing (секвенирование нового поколения)

(O)MIM – (Online) Mendelian Inheritance in Man, электронная база данных о генетических заболеваниях «Менделевское наследование у человека»

Real-time ПЦР – ПЦР в режиме реального времени

SNP – single nucleotide polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)

SSP – sessile serrated polyp (зубчатая аденома на широком основании)

TMB – tumour mutation burden (мутационная нагрузка опухоли)

TSA – traditional serrated adenoma (традиционная зубчатая аденома)

vs – versus (против)

VUS – variant of unknown significance (вариант с неизвестным клиническим значением)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алиев, В.А. Выбор тактики лечения больных колоректальным раком с синхронными отдаленными метастазами: автореф. дис. докт. мед. наук: 14.01.12 / Алиев Вячеслав Афандиевич. – М., 2015. - 42 с.
2. Давыдов, М.И. Статистика злокачественных новообразований в 2014 г. / М.И. Давыдов, Е.М. Аксель // Евразийский онкологический журнал. – 2015. - № 4. - С. 692-879.
3. Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018 г. - 236 стр.
4. Красильников, М.А., Молекулярный канцерогенез / М.А. Красильников, И.Б. Зборовская. – Москва: ИД «АБВ-пресс» ООО, 2016. - 416 с.
5. Цуканов, А.С. Стратегия комплексного молекулярно-генетического изучения наследственных форм колоректального рака у российских пациентов: автореф. дис. докт. мед. наук: 03.02.07 / Цуканов Алексей Сергеевич. - М., 2017. – 47 с.
6. Abdelsattar, Z.M. Colorectal cancer outcomes and treatment patterns in patients too young for average-risk screening / Z.M. Abdelsattar, S.L. Wong, S.E. Regenbogen et al. // Cancer. – 2016. – Vol. 122(6). – P. 929-934.
7. Alici, S. Colorectal cancer in young patients: characteristics and outcome / S. Alici, N.F. Aykan, B. Sakar et al. // Tohoku J. Exp. Med. – 2003. – Vol. 199(2). – P. 85-93.
8. American Society of clinical oncology. Hereditary Colorectal Cancer Syndromes Endorsement of the Familial Risk–Colorectal Cancer ESMO Guideline [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.asco.org/endorsements/HereditaryCRC.
9. Andre, T. Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF

Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study / T. Andre, A. de Gramont, D. Vernerey et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2015. - Vol. 33. - P. 4176-4187.

10. Aretz, S. Frequency and parental origin of de novo APC mutations in familial adenomatous polyposis / S. Aretz, S. Uhlhaas, R. Caspari et al. // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2004. – Vol. 12(1). – P. 52-58.

11. Arriba, M. DNA copy number profiling reveals different patterns of chromosomal instability within colorectal cancer according to the age of onset / M. Arrib, J.L. García, L. Inglada-Pérez et al. // *Mol. Carcinog.* – 2016. – Vol. 55(5). – P. 5-16.

12. Bacher, J.W. Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-High tumors / J.W. Bacher, L.A. Flanagan, R.L. Smalley et al. // *Dis. Markers.* - 2004. – Vol. 20. – P. 237–250.

13. Baglietto, L. Risks of Lynch syndrome cancers for MSH6 mutation carriers / L. Baglietto, N.M. Lindor, J.G. Dowty et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* - 2010. – Vol. 102(3). – P. 193-201.

14. Bailey, C.E. Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States 1975-2010. / C.E. Bailey, C.Y. Hu, Y.N. You et al. // *JAMA Surg.* – 2015. – Vol. 150(1). – P. 17-22.

15. Ballester, V. Clinical and molecular features of young-onset colorectal cancer / V. Ballester, S. Rashtak S., L. Boardman // *World J. Gastroenterol.* – 2016. – Vol. 22(5). – P. 1736-1744.

16. Balmaña, J. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines / J. Balmaña, F. Balaguer, A. Cervantes, D. Arnold on behalf of the ESMO Guidelines Working Group // *Annals of Oncology.* – 2013. – Vol. 24 (Supplement 6): vi73-vi80.

17. Barault, L. Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population-based series of 582 cases / L. Barault, C. Charon-Barra, V. Jooste et al. // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68. – P. 8541–8546.

18. Barnetson, R.A. Identification and survival of carriers of mutations in DNA mismatch-repair genes in colon cancer / R.A. Barnetson, A. Tenesa, S.M.

Farrington et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol. 354(26). – P. 2751-2763.

19. Bastide, N.M. Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: A meta-analysis and a review of the mechanisms involved / N.M. Bastide, F.H.F. Pierre, D.E. Corpet // *Cancer Prev. Res.* – 2011. – Vol. 4. – P. 177–184.

20. Bertagnolli, M.M. Microsatellite instability and loss of heterozygosity at chromosomal location 18q: prospective evaluation of biomarkers for stages II and III colon cancer--a study of CALGB 9581 and 89803 / M.M. Bertagnolli, M. Redston, C.C. Compton et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 29(23). – P. 3153-3162.

21. Bettington, M. The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges / M. Bettington, N. Walker, A. Clouston et al. // *Histopathology.* - 2013. – Vol. 62(3). – P. 367-386.

22. Bhullar, D.S. Biomarker concordance between primary colorectal cancer and its metastases / D.S. Bhullar, J. Barriuso, S. Mullamitha et al. // *EBioMedicine.* – 2019. – Vol. 40. – P. 363–374.

23. Bibbins-Domingo, K. Aspirin Use for the Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Colorectal Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement / K. Bibbins-Domingo et al. // *Ann. Intern. Med.* – 2016. – Vol. 64(12). – P. 836-845.

24. Bisgaard, M.L. Familial adenomatous polyposis (FAP): genotype correlation to FAP phenotype with osteomas and sebaceous cysts / M.L. Bisgaard, S. Bülow // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2006. – Vol. 140(3). – P. 200-204.

25. Blons, H. Prognostic value of KRAS mutations in stage III colon cancer: post hoc analysis of the PETACC8 phase III trial dataset / H. Blons, J.F. Emile, K. le Malicot et al. // *Ann. Oncol.* – 2014. – Vol. 25(23). – P. 8-85.

26. Boland, C. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer / C. Boland, S. Thibodeau, S. Hamilton et al. // *Cancer Res.* – 1998. – Vol. 58. – P. 5248–5257.

27. Boland, C.R. Familial colonic cancer without antecedent polyposis / C.R.

Boland, F.J. Troncale // *Annals of internal medicine.* – 1984. – Vol. 100(5). – P. 700-701.

28. Bombard, Y. Translating genomics in cancer care / Y. Bombard, P.B. Bach, K. Offit et al. // *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* – 2013. – Vol. 11(11). – P. 1343-1353.

29. Bonadona, V. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome / V. Bonadona, B. Bonaïti, S. Olschwang et al. // *JAMA.* – 2011. – Vol. 305(22). – P. 2304-2310.

30. Bonetti, L.R. Clinical Impact and Prognostic Role of KRAS/BRAF/PIK3CA

Mutations in Stage I Colorectal Cancer / L.R. Bonetti, V. Barresi, A. Maiorana et al. // *Disease Markers.* – 2018. - ID 295980.

31. Bosman, F.T. Molecular Pathology of Colorectal Cancer / F.T. Bosman // In the book «Molecular surgical pathology» eds. L. Cheng, J.N. Eble. – New York.: «Springer Science+Business Media», 2013. – P. 1-16.

32. Botteri, E. Smoking and colorectal cancer: A meta-analysis / E. Botteri, S. Iodice, V. Bagnardi et al. // *JAMA.* – 2008. – Vol. 300. – P. 2765–2778.

33. Bouvard, V. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat / V. Bouvard, D. Loomis, K.Z. Guyton et al. // *Lancet Oncol.* – 2015. – Vol. 16(16). – P. 1599-1600.

34. Bronner, C.E. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer / C.E. Bronner, S.M. Baker, P.T. Morrison et al. // *Nature.* – 1994. – Vol. 368(6468). – P. 258-261.

35. Burner, G. C. Mutations in the KRAS2 oncogene during progressive stages of human colon carcinoma / G.C. Burner, L. Loeb // *A. Proc. Nat. Acad. Sci.* – 1989. - Vol. 86. – P. 2403-2407.

36. Burt, R.W. Genetic testing and phenotype in a large kindred with attenuated familial adenomatous polyposis / R.W. Burt, M.F. Leppert, M.L. Slattery et al. - *Gastroenterology.* – 2004. – Vol. 127(2). – P. 444-4451.

37. Burt, R. Inheritance of Colorectal Cancer / R. Burt // *Drug Discov. Today Dis. Mech.* – 2007. – Vol. 4(4). – P. 293-300.

38. Bussey, H.J.R. Familial polyposis coli / Bussey, H.J.R. // Baltimore: John Hopkins University Press. - 1975.
39. Calabrese, P. Colorectal pretumor progression before and after loss of DNA mismatch repair / P. Calabrese, J.L. Tsao, Y. Yatabe et al. // Am. J. Pathol. - 2004. – Vol. 164. – P. 1447–1453.
40. Campisi, J. Cellular senescence: when bad things happen to good cells / J. Campisi, F. d'Adda di Fagagna // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2007. – Vol. 8. – P. 729–740.
41. Canavan, C. Meta-analysis: Colorectal and small bowel cancer risk in patients with crohn's disease / C. Canavan, K.R. Abrams, J. Mayberry // Aliment. Pharmacol. Therap. – 2006. – Vol. 23. – P. 1097–1104.
42. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer / The Cancer Genome Atlas Network (326 collaborators). – Nature. – Vol. 487(7407). – P. 330–337.
43. Carethers, J.M. Lynch syndrome and Lynch syndrome mimics: The growing complex landscape of hereditary colon cancer / J.M. Carethers, E.M. Stoffel // World J. Gastroenterol. – 2015. – Vol. 21(31). – P. 9253-9261.
44. Cavestro, G.M. Early onset sporadic colorectal cancer: Worrisome trends and oncogenic features // Dig. Liver Dis. – 2018. – Vol. 50(6). – P. 521-532.
45. Cercek, A. Clinical features and outcomes of patients with colorectal cancers harboring NRAS mutations / A. Cercek, M.I. Braghiroli, J.F. Chou et al. // Clin. Cancer Res. – 2017. – Vol. 23(16). –P. 4753–4760.
46. Chan, A.O. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum / A.O. Chan, R.R. Broaddus, P.S. Houlihan et al. // Am. J. Pathol. – 2002. Vol. 160. – P. 1823–1830.
47. Chan, A.T. Primary prevention of colorectal cancer / A.T. Chan, E.L. Giovannucci // Gastroenterology. – 2010. – Vol. 138(6). – P. 2029-2043.e10.
48. Chang, D.T. Clinicopathologic and molecular features of sporadic early-onset colorectal adenocarcinoma: an adenocarcinoma with frequent signet ring cell differentiation, rectal and sigmoid involvement, and adverse morphologic features / D.T.

Chang, R.K. Pai, L.A. Rybicki et al. // *Mod. Pathol.* – 2012. – Vol. 25(8). – P. 1128-1139.

49. Chiu, J.W. Molecular profiling of patients with advanced colorectal cancer: Princess Margaret Cancer Centre experience / J.W. Chiu, K.M. Krzyzanowska, S. Serra et al. // *Clinical Colorectal Cancer.* – 2017. - CLCC 404.

50. Chao, C. Cystathionine-beta-synthase inhibition for colon cancer: Enhancement of the efficacy of aminooxyacetic acid via the prodrug approach / C. Chao, J. Zatarain, Y. Ding et al. // *Mol. Med.* – 2016. – Vol. 22. – P. 54-63.

51. Choi, Y. Screening for colorectal cancer / Y. Choi, H.F. Sateia, K.S. Peairs et al. // *Semin. Oncol.* – 2017. – Vol. 44(1). – P. 34-44.

52. Chong, L.C. Outcomes for Metastatic Colorectal Cancer Based on Microsatellite Instability: Results from the South Australian Metastatic Colorectal Cancer Registry / L.C. Chong, A.R. Townsend, J. Young et al. // *Targeted Oncology.* – 2019. – Epub ahead of print.

53. Chun, Y.S. Local Therapy for Colorectal Liver Metastases: Establishing Today's Level of Evidence and Defining Tomorrow's Roadmap / Y.S. Chun, J.N. Vauthey // *J Natl Cancer Inst.* – 2017. – Vol. 109(9).

54. Chung, Y.F. Young age is not a poor prognostic marker in colorectal cancer / Y.F. Chung, K.W. Eu, D. Machin et al. // *Br. J. Surg.* – 1998. – Vol. 85(9). – P. 1255-1259.

55. Ciani, O. Validation of surrogate endpoints in advanced solid tumors: systematic review of statistical methods, results, and implications for policy makers / O. Ciani, S. Davis, P. Tappenden P et al. // *Int. J. Technol. Assess. - Health Care.* – 2014. - Vol. 30(3). – P. 312-324.

56. Copija, A. Clinical Significance and Prognostic Relevance of Microsatellite Instability in Sporadic Colorectal Cancer Patients / A. Copija, D. Waniczek, A. Witko's et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18. – P. 107

57. Cragun, D. Panel-based testing for inherited colorectal cancer: a descriptive study of clinical testing performed by a US laboratory /D. Cragun, C. Radford, J.S. Dolinsky // *Clin. Genet.* – 2014. – Vol. 86(6). – P. 510-520.

58. Dempsey, K.M. Is it all Lynch Syndrome? An assessment of family history in individuals with mismatch repair deficient tumors / K.M. Dempsey, R. Broaddus, Y. Nancy You et al. // *Genet. Med.* – 2015. – Vol. 17(6). – P. 476–484.
59. Der, C. J. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses / C.J. Der, T.G. Krontiris, G.M. Cooper // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 1982. – Vol. 79. – P. 3637-3640.
60. Domingo, E. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing / E. Domingo, P. Laiho, M. Ollikainen et al. // *J. Med. Genet.* – 2004. – Vol. 41. – P. 664–668.
61. Dominguez-Valentin, M. Mutation spectrum in South American Lynch syndrome families / M. Dominguez-Valentin, M. Nilbert, P. Wernhoff et al. // *Hered. Cancer Clin. Pract.* – 2013. – Vol. 11(1). – P. 18.
62. Dominguez-Valentin, M. Frequent mismatch-repair defects link prostate cancer to Lynch syndrome / M. Dominguez-Valentin, P. Joost, C. Therkildsen et al. // *BMC Urol.* – 2016. - Vol. 16. – P. 15.
63. Douillard, J.Y. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study / J.Y. Douillard, S. Siena, J. Cassidy et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28(31). – P. 4697-4705.
64. Douillard, J.Y. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer / J.Y. Douillard, K.S. Oliner, S. Siena et al. // *N. Engl. J. Med.* - 2013. – Vol. 369. – P. 1023 – 1034.
65. Dulak, A.M. Exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma identifies recurrent driver events and mutational complexity / A.M. Dulak, P. Stojanov, S. Peng et al. // *Nat. Genet.* – 2013. – Vol. 45. – P. 478–486.
66. Eaden J.A., Abrams K.R., Mayberry J.F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: A meta-analysis. *Gut.* 2001;48:526–535.
67. Elez, E. Abituzumab combined with cetuximab plus irinotecan versus cetuximab plus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type metastatic colorectal

cancer: the randomised phase I/II POSEIDON trial / E. Elez, I. Kocakova, T. Hohler et al. // *Ann Oncol.* – 2015. – Vol. 26. – P. 132-140.

68. Fante, R. Colorectal carcinoma in different age groups: a population-based investigation / R. Fante, P. Benatti, C. di Gregorio et al. // *Am. J. Gastroenterol.* – 1997. – Vol. 92(9). – P. 1505-1509.

69. Fearon, E.R. A genetic model for colorectal tumorigenesis / E.R. Fearon, B. Vogelstein B. // *Cell.* – 1990. – Vol.1(61). – P. 759-767.

70. Feng, X. Characteristics of benign and malignant thyroid disease in familial adenomatous polyposis patients and recommendations for disease surveillance / X. Feng, M. Milas, M. O'Malley M et al. // *Thyroid.* – 2015. – Vol. 25(3). – P. 325-332.

71. Ferlay, J. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 / J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit et al. // *Int. J. Cancer.* – 2015. – Vol. 136(5). – P. e359–386.

72. Fishel, R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer / R. Fishel, M.K. Lescoe, M.R. Rao et al. // *Cell.* – 1993. – Vol. 75(5). – P. 1027-1038.

73. Foltran, L. Prognostic role of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in advanced colorectal cancer / G. de Maglio, N. Pella, p. Ermacora et al. // *Future Oncol.* – 2015. – Vol. 11(4). – P. 629-640.

74. Fong, Y. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases / Y. Fong, J. Fortner, R.L. Sun et al. // *Ann. Surg.* – 1999. – Vol. 230. – P. 309–318.

75. Fong, Y. Surgical therapy of hepatic colorectal metastasis / Y. Fong, J. Salo // *Semin Oncol.* – 1999. – Vol. 26(5). – P. 514-523.

76. Franko, J. Prognosis of patients with peritoneal metastatic colorectal cancer given systemic therapy: an analysis of individual patient data from prospective randomised trials from the Analysis and Research in Cancers of the Digestive System (ARCAD) database / J. Franko, Q. Shi, J.P. Meyers et al. // *Lancet Oncol.* – 2016. – Vol. 17(12). – P. 1709-1719.

77. Fujiyoshi, K. Metastatic Pattern of Stage IV Colorectal Cancer with High-

Frequency Microsatellite Instability as a Prognostic Factor / K. Fujiyoshi, G. Yamamoto, T. Takenoya et al. // *Anticancer Res.* – 2017. – Vol .37(1). – P. 239-247.

78. Fujiyoshi, K. High concordance rate of KRAS/BRAF mutations and MSI-H between primary and corresponding metastases / K. Fujiyoshi, G. Yamamoto, A. Takahashi et al. // *Oncol. Rep.* – 2017. – Vol. 37. –P. 785–792.

79. Gagnière, J. Is hepatectomy justified for BRAF mutant colorectal liver metastases? A multi-institutional analysis of 1497 patients / J. Gagnière, A. Dupré, S.S. Gholami et al. // *Ann Surg.* – 2018. – Vol. 1.

80. Gallego, C.J. Next-Generation Sequencing Panels for the Diagnosis of Colorectal Cancer and Polyposis Syndromes: A Cost-Effectiveness Analysis / C.J.Gallego, B.H. Shirts, C.S. Bennette et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2015. – Vol. 33(18). – p. 2084-2091.

81. Gardner E.J. A genetic and clinical study of intestinal polyposis, a predisposing factor for carcinoma of the colon and rectum / E. J. Gardner // *Am. J. Hum. Genet.* – 1951. – Vol. 3(2). – P. 167–176.

82. Garre, P. Cancer risk and overall survival in mismatch repair proficient hereditary non-polyposis colorectal cancer, Lynch syndrome and sporadic colorectal cancer / P. Garre, L. Martín, I. Bando et al. // *Familial Cancer.* – 2013. – Vol. 13(1). – P. 109–119.

83. Gao, XH. Differences of protein expression profiles, KRAS and BRAF mutation, and prognosis in right-sided colon, left-sided colon and rectal cancer / X.H. Gao, G.Y. Yu, H.F. Gong et al. // *Sci. Rep.* – 2017. - Vol. 7(1). – P. 7882.

84. Gavin, P.G. Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: an assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value / P.G. Gavin, L.H. Colangelo, D. Fumagalli et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2012. – Vol. 18. – P. 6531-6541.

85. Guerrero, F. Surgery of colorectal cancer lung metastases: analysis of survival, recurrence and re-surgery / F. Guerrero, C. Mossetti, M.J. Ceccarelli et al. // *J Thorac Dis.* – 2016. – Vol. 8(7). – P. 1764-1771.

86. Goecke, T. Genotype-Phenotype Comparison of German MLH1 and

MSH2 Mutation Carriers Clinically Affected With Lynch Syndrome: A Report by the German HNPCC Consortium / T. Goecke, K. Schulmann, C. Engel et al. // *Journal of Clinical Oncology*. / 2006. – Vol. 24(26). – P. 4285–4292.

87. Goldstein, J. Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H) / J. Goldstein, B. Tran, J. Ensor et al. // *Ann. Oncol.* – 2014. – Vol. 25(5). – P. 1032-1038.

88. Grady, W.M. Genomic instability and colon cancer / W.M. Grady // *Cancer Metastasis Rev.* – 2004. – Vol. 23. – P. 11–27.

89. Grady, W.M. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis / W.M. Grady, J.M. Carethers // *Gastroenterology*. – 2008. - Vol. 135. – P. 1079–1099.

90. Grady W.M. The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening / W. M. Grady, D. Sanford, D. Markowitz // *Dig. Dis. Sci.* – 2015. – Vol. 60(3). – P. 762–772.

91. Groden, J. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene / J. Groden, A. Thliveris, W. Samowitz et al. // *Cell*. – 1991. – Vol. 66(3). – P. 589-600.

92. Grover, S. Prevalence and phenotypes of APC and MUTYH mutations in patients with multiple colorectal adenomas / S. Grover, F. Kastrinos, E.W. Steyerberg et al. // *JAMA*. – 2012. - Vol. 308(5). – P. 485-492.

93. Guedes, J.G. High resolution melting analysis of KRAS, BRAF and PIK3CA in KRAS exon 2 wild-type metastatic colorectal cancer / J.G. Guedes, I. Veiga, P. Rocha et al. // *BMC Cancer*. – 2013. – Vol. 13. – P. 169.

94. Guinney, J. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer / J. Guinney, R. Dienstmann, X. Wang et al. - *Nat Med*. – 2015. – Vol. 21(11). – P. 1350–1356.

95. Haigis, K.M. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon / K.M. Haigis, K.R. Kendall, Y. Wang et al. // *Nat. Genet.* – 2008. – Vol. 40(5). – P. 600-608.

96. Hall, A. Human N-ras: cDNA cloning and gene structure / A. Hall, R.

Brown // *Nucleic Acids Res.* – 1985. – Vol. 13. – P. 5255-5268.

97. Hall, M.J. Gene panel testing for inherited cancer risk / M.J. Hall, A.D. Forman, R. Pilarski et al. // *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* – 2014. – Vol. 12(9). – P. 1339-1346.

98. Hampel, H. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients / H. Hampel, W. Frankel, J. Panescu et al. // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66(15). – P. 7810-7817.

99. Haraldsdottir, S. Prostate cancer incidence in males with Lynch syndrome / S. Haraldsdottir, H. Hampel, L. Wei et al. // *Genet. Med.* – 2014. – Vol. 6(7). – P. 553-557.

100. Harkness, E.F. Lynch syndrome caused by MLH1 mutations is associated with an increased risk of breast cancer: a cohort study / *J. Med. Genet.* – 2015. – Vol. 52(8). – P. 553-556.

101. Haugen, A.C. Genetic instability caused by loss of MutS homologue 3 in human colorectal cancer / A.C. Haugen, A. Goel, K. Yamada et al. // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68(20). – P. 8465-8472.

102. Herraiz, M. Prevalence of thyroid cancer in familial adenomatous polyposis syndrome and the role of screening ultrasound examinations / M. Herraiz, G. Barbesino, W. Faquin et al. // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* – 2007. – Vol. 5(3). – P. 367-373.

103. Hinoue, T. Analysis of the association between CIMP and BRAF in colorectal cancer by DNA methylation profiling / T. Hinoue, D.J. Weisenberger, F. Pan et al. // *PLoS One.* – 2009. – Vol. 4. – P. e8357.

104. Hsu, Y.N. A new classification scheme for recurrent or metastatic colon cancer after liver metastasectomy / Y.N. Hsu, J.K. Lin, W.S. Chen et al. // *J Chin Med Assoc.* – 2011. – Vol. 74(11). – P. 493-499.

105. Hugen, N. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype / N. Hugen, C.J. van de Velde, J.H. de Wilt et al. // *Ann. Oncol.* – 2014. – Vol. 25(3). – P. 651-657.

106. Imperiale, T.F. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer

screening / T.F. Imperiale, D.F. Ransohoff, S.H. Itzkowitz et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2014. – Vol. 370. – P. 1287–1297.

107. Inoue, A. B-RAF mutation and accumulated gene methylation in aberrant crypt foci (ACF), sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) and cancer in SSA/P / A. Inoue, K. Okamoto, Y. Fujino et al. // *Br. J. Cancer.* – 2015. – Vol. 112(2). – P. 403-412.

108. Inra, J.A. Colorectal cancer in young adults / J.A. Inra, S. Syngal // *Dig. Dis. Sci.* – 2015. – Vol. 60(3). – P. 722-733.

109. International Agency for Research on Cancer [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.

110. Ichimura, K. Molecular pathogenesis of IDH mutations in gliomas / K. Ichimura // *Brain Tumor Pathol.* – 2012. – Vol. 29. – P. 131–139.

111. Innocenti, F. Mutational Analysis of Patients With Colorectal Cancer in CALGB/SWOG 80405 Identifies New Roles of Microsatellite Instability and Tumor Mutational Burden for Patient Outcome / F. Innocenti, F.-S. Ou, X. Qu et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2019. – Vol. 37.

112. Isbister, W.H. Large-bowel cancer in the young: a national survival study / W.H. Isbister, J. Fraser // *Dis. Colon Rectum.* – 1990. – Vol. 33(5). – P. 363-366.

113. Issa, J.P. CIMP, at last / J.P. Issa, L. Shen, M. Toyota // *Gastroenterology.* – 2005. – Vol. 129. – P. 1121–1124.

114. Issa, J.P. Aging and epigenetic drift: a vicious cycle / J.P. Issa // *J. Clin. Invest.* – 2014. – Vol. 124. – P. 24–29.

115. Jacobs, D. Defining Early-Onset Colon and Rectal Cancers / D. Jacobs, R. Zhu, J. Luo et al. // *Front. Oncol.* – 2018. – Vol. 8. – P. 504.

116. Jasperson, K.W. Hereditary and familial colon cancer / K.W. Jasperson, T.M. Tuohy, D.W. Neklason et al. // *Gastroenterology.* – 2010. – Vol. 138(6). – P. 2044-2058.

117. Jass, J.R. Advanced colorectal polyps with the molecular and morphological features of serrated polyps and adenomas: concept of a ‘fusion’ pathway to colorectal cancer / J.R. Jass, K. Baker, I. Zlobec et al. // *Histopathology.* – 2006. – Vol. 49. – P. 121–131.

118. Jass, J.R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features / J.R. Jass // *Histopathology*. – 2007. - Vol. 50(1). – P. 113-130.
119. Johnson, B. Impact of metastasectomy in the multimodality approach for BRAF V600E metastatic colorectal cancer: the Mayo Clinic experience / B. Johnson, Z. Jin, M.J. Truty et al. // *Oncologist*. – 2018. – Vol. 23. – P. 128-134.
120. Jones, J.C. Non-V600 BRAF Mutations Define a Clinically Distinct Molecular Subtype of Metastatic Colorectal Cancer / J.C. Jones, L.A. Renfro, H.O. Al-Shamsi et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2017. – Vol. 35(23). – P. 2624-2630.
121. Joost, P. Urinary Tract Cancer in Lynch Syndrome; Increased Risk in Carriers of MSH2 Mutations / P. Joost, C. Therkildsen, M. Dominguez-Valentin et al. // *Urology*. – 2015. – Vol. 86(6). – P. 1212-1217.
122. Kalady, M.F. Adenomas in Lynch syndrome: don't be fooled by the "non" in hereditary nonpolyposis colorectal cancer / M.F. Kalady, S. Kravochuk, L. LaGuardia et al. // *Fam. Cancer*. – 2013. – Vol. 12(2). – P. 53.
123. Kang, J. Current clinical trials testing the combination of immunotherapy with radiotherapy / J. Kang, S. Demaria, S.J. Formenti // *J. Immunother. Cancer*. – 2016. – Vol. 20(4:51).
124. Kanth, P. Hereditary Colorectal Polyposis and Cancer Syndromes: A Primer on Diagnosis and Management / P. Kanth, J. Grimmatt, M. Champine et al. // *Am. J. Gastroenterol.* – 2017. – Vol. 112(10). – P. 1509-1525.
125. Kanthan, R. Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review / R. Kanthan, J.L. Senger, S.C. Kanthan // *Patholog. Res. Int.* - 2012. – ID 597497.
126. Kastrinos, F. Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome / F. Kastrinos, B. Mukherjee, N. Tayob et al. // *JAMA*. - 2009. – Vol. 302(16). – P. 1790-1795.
127. Kastrinos, F. History, Genetics, and Strategies for Cancer Prevention in Lynch Syndrome / F. Kastrinos, E.M. Stoffel // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* – 2014. – Vol. 12(5). – P. 715–727.

128. Kavuri, S.M. HER2 activating mutations are targets for colorectal cancer treatment / S.M. Kavuri, N. Jain, F. Galimi et al. // *Cancer Discov.* – 2015. – Vol. 5. – P. 832-841.
129. Kawazoe, A. A retrospective observational study of clinicopathological features of *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* mutations in Japanese patients with metastatic colorectal cancer / A. Kawazoe, K. Shitara, S. Fukuoka et al. // *BMC Cancer.* – 2015. – Vol. 15. - P. 258.
130. Kerr, S.E. APC Germline Mutations in Individuals Being Evaluated for Familial Adenomatous Polyposis A Review of the Mayo Clinic Experience with 1591 Consecutive Tests / S.E. Kerr, C.B. Thomas, S.N. Thibodeau et al. // *J. Mol. Diagn.* – 2013. – Vol. 5(1). – P. 31-43.
131. Khan, S.A. Colorectal cancer in the very young: a comparative study of tumor markers, pathology and survival in early onset and adult onset patients / S.A. Khan, M. Morris, K. Idrees et al. // *J. Pediatr. Surg.* – 2016. – Vol. 51(11). – P. 1812-1817.
132. Kim, C.G. Effects of microsatellite instability on recurrence patterns and outcomes in colorectal cancers / C.G. Kim, J.B. Ahn, M. Jung et al. // *Br. J. Cancer.* – 2016. – Vol. 115(1). – P. 25-33.
133. Kim, J.Y. Post-pulmonary metastasectomy prognosis after curative resection for colorectal cancer / J.Y. Kim, I.J. Park, H.R. Kim et al. // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8(22). – Vol. 36566-36577.
134. Kim, K.P. Paired primary and metastatic tumor analysis of somatic mutations in synchronous and metachronous colorectal cancer / K.P. Kim, J.E. Kim, Y.S. Hong et al. // *Cancer Res. Treat.* – 2017. – Vol. 49. – P. 161–167.
135. Kim, S.A. Loss of CDH1 (E-cadherin) expression is associated with infiltrative tumour growth and lymph node metastasis / S.A. Kim, K. Inamura, M. Yamauchi et al. // *Br. J. Cancer.* – 2016. – Vol. 114(2). – P. 199-206.
136. Kim, T. J. Survival Outcome and Risk of Metachronous Colorectal Cancer After Surgery in Lynch Syndrome / T.J. Kim, E.R. Kim, S.N. Hong et al. // *Annals of Surgical Oncology.* – 2016. – Vol. 24(4). – P. 1085–1092.

137. Klaver, Y.L. Outcomes of colorectal cancer patients with peritoneal carcinomatosis treated with chemotherapy with and without targeted therapy / Y.L. Klaver, L.H. Simkens, V.E. Lemmens et al. // *Eur. J. Surg. Oncol.* – 2012. – Vol. 38. – P. 617–623.

138. Klingbiel, D. Prognosis of stage II and III colon cancer treated with adjuvant 5-fluorouracil or FOLFIRI in relation to microsatellite status: results of the PETACC-3 trial / D. Klingbiel, Z. Saridaki, A.D. Roth et al. // *Ann. Oncol.* – 2015. – Vol. 26(1). - P. 126-132.

139. Kohlmann, W. Lynch syndrome. Gene Reviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource / W. Kohlmann, S.B. Gruber // University of Washington, Seattle. - 1993-2014. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.genetests.org>.

140. Köhne, C.H. Cunningham D, Di Costanzo F, et al. Clinical determinants of survival in patients with 5-fluorouracil-based treatment for metastatic colorectal cancer: results of a multivariate analysis of 3825 patients / C.H. Köhne, D. Cunningham, F. Di Costanzo et al. // *Ann. Oncol.* – 2002. - Vol. 13. – P. 308–317.

141. Koopman, M. Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer / M. Koopman, G.A. Kortman, L. Mekenkamp et al. // *Br. J. Cancer.* – 2009. – Vol. 100(2). – P. 266-273.

142. Kranenburg, O. The KRAS oncogene: past, present, and future / O. Kranenburg // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2005. – Vol. 1756. – P. 81-82.

143. Landy, J. Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer / J. Landy, E. Ronde, N. English et al. // *World J. Gastroenterol.* – 2016. – Vol. 22(11). – P. 3117-3126.

144. Lao, V.V. Epigenetics and colorectal cancer / V.V. Lao, W.M. Grady // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2011. – Vol. 8. – P. 686–700.

145. Lee, P.Y. Colorectal cancer in young patients: characteristics and outcome / P.Y. Lee, W.S. Fletcher, E.S. Sullivan et al. // *Am. Surg.* – 1994. – Vol. 60(8). – P. 607-612.

146. Levin, B. Screening and surveillance for the early detection of colorectal

cancer and adenomatous polyps. A joint guideline from the American cancer society, the US multi-society task force on colorectal cancer, and the American college of radiology / B. Levin, D.A. Lieberman, B. McFarland et al. // *CA Cancer J. Clin.* – 2008. – Vol. 58. – P. 130–160.

147. Liang, J.T. Clinicopathological and molecular biological features of colorectal cancer in patients less than 40years of age / *Br. J. Surg.* – 2003. – Vol. 90(2). – P. 205-214.

148. Lichtenstein, P. Environmental and heritable factors in the causation of cancer: analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland / P. Lichtenstein, N.V. Holm, P.K. Verkasalo et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 343. – P. 78-84.

149. Lieu, C.H. Association of age with survival in patients with metastatic colorectal cancer: analysis from the ARCAD Clinical Trials Program / C.H. Lieu, L.A. Renfro, A. de Gramont et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2014. – Vol. 32. –P. 2975–2984.

150. Limaiem, F. Colorectal cancer in young adults: a retrospective study of 32 tunisian patients / F. Limaiem, S. Azzabi, A. Sassi et al. // *Pan. Afr. Med. J.* – 2018. - Vol. 31. – P. 62.

151. Liu, D. DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells / D. Liu, G. Keijzers, L.J. Rasmussen // *Mutat. Res.* – 2017. – Vol. 773. – Vol. 174-187.

152. Liu, J. Predictive and Prognostic Implications of Mutation Profiling and Microsatellite Instability Status in Patients with Metastatic Colorectal Carcinoma / J. Liu, W. Zeng, C. Huang et al. // *Gastroenterology Research and Practice.* – Vol. 2018. - ID 4585802.

153. Losi, L. Molecular genetic alterations and clinical features in early-onset colorectal carcinomas and their role for the recognition of hereditary cancer syndromes / L. Losi, C. Di Gregorio, M. Pedroni et al. // *Am. J. Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 100(10). – P. 2280-2287.

154. Loupakis, F. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer / F. Loupakis, A. Ruzzo, C. Cremolini et al. // *Br. J. Cancer.* – 2009. – Vol.

101(4). – P. 715-721.

155. Luo, L. CpG island methylation in aberrant crypt foci and cancers from the same patients / L. Luo, W. Chen, T. Pretlow // *Int. J. Cancer.* – 2005. – Vol. 115. – P. 747–751.

156. Lynch, H.T. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds / H.T. Lynch, M.W. Shaw, C.W. Magnuson et al. // *Arch. Intern. Med.* - 1966. – Vol. 117(2). – P. 206-212.

157. Maccaroni, E. Prognostic impact of mismatch repair genes germline defects in colorectal cancer patients: are all mutations equal? / E. Maccaroni, R. Bracci, R. Giampieri et al. / *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6(36). – P. 38737-38748.

158. Mäkelä, J.T. Clinicopathological features of colorectal cancer in patients under 40 years of age / J.T. Mäkelä, H. Kiviniemi // *Int. J. Colorectal. Dis.* – 2010. – Vol. 25(7). – P. 823-828.

159. Margonis, G.A. Mutation status and surgical selection / G.A. Margonis, M.E. Kreis, C.L. Wolfgang et al. // *J Surg Oncol.* – 2019. – Vol. 119(5). – P. 616-622.

160. Mármol, I. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer / I. Mármol, C. Sánchez-de-Diego, A. Pradilla Dieste et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 19;18(1). - pii: E197.

161. Marshall, C.J. A transforming gene present in human sarcoma cell lines / C.J. Marshall, A. Hall, R.A. Weiss // *Nature.* – 1982. – Vol. 299. – P. 171-173.

162. Martinez-Useros, J. Obesity and colorectal cancer: Molecular features of adipose tissue / J. Martinez-Useros, J. Garcia-Foncillas // *J. Transl. Med.* – 2016. – Vol. 14. – P. 21.

163. Matsuzaki, K. The relationship between global methylation level, loss of heterozygosity, and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer / K. Matsuzaki, G. Deng, H. Tanaka et al. // *Clin. Cancer Res.* - 2005. – Vol. 11. – P. 8564–8569.

164. Mauer, C.B. The integration of next-generation sequencing panels in the clinical cancer genetics practice: an institutional experience / C.B. Mauer, S.M.

Pirzadeh-Miller, L.D. Robinson et al. // *Genet. Med.* – 2014. – Vol. 16(5). – P. 407-412.

165. Maughan T.S. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial / T.S. Maughan, R.A. Adams, C.G. Smith et al. // *Lancet.* – 2011. – Vol. 377(9783). – P. 2103–2114.

166. Mauri, G. Early-onset colorectal cancer in young individuals / G. Mauri, A. Sartore-Bianchi, A.G. Russo et al. // *Mol. Oncol.* – 2019. – Vol. 13(2). – P. 109-131.

167. McGrath, J.P. Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene / J.P. McGrath, D.J. Capon, D.H. Smith et al. // *Nature.* – 1983. - Vol. 304. – P. 501-506.

168. Michaloglou, C. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi / C. Michaloglou, L.C. Vredeveld, M.S. Soengas et al. // *Nature.* - 2005. – Vol. 436. – P. 720–724.

169. Michiels, S. Progression-free survival as surrogate end point for overall survival in clinical trials of HER2-targeted agents in HER2-positive metastatic breast cancer / S. Michiels, L. Pugliano, S. Marguet et al. // *Ann. Oncol.* – 2016. – Vol. 27(6). – P. 1029–1034.

170. Michiels, S. Progression-Free Survival as a Surrogate for Overall Survival in Clinical Trials of Targeted Therapy in Advanced Solid Tumors / S. Michiels, E.D. Saad, M. Buyse // *Drugs.* – 2017. – Vol. 77(7). – P. 713-719.

171. Minardi, A.J. Jr. Colorectal cancer in the young patient / A. J. Jr. Minardi, K.M. Sittig, G.B. Zibari et al. // *Am. Surg.* – 1998. – Vol. 64(9). – P. 849-853.

172. Missiaglia, E. Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features / E. Missiaglia, B. Jacobs, G. D'Ario et al. // *Ann. Oncol.* – 2014. – Vol. 25(10). – P. 1995-2001.

173. MLH1, MSH2, and MSH6 gene mutation probabilities [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www4.utsouthwestern.edu/breasthealth/cagene/>.

174. Modest, D.P. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group / D.P. Modest, I.

Ricard, V. Heinemann et al. // *Ann. Oncol.* – 2016. – Vol. 27(9). – P. 1746-1753.

175. Mohan, H.M. Microsatellite instability is associated with reduced disease specific survival in stage III colon cancer / H.M. Mohan, E. Ryan, I. Balasubramanian et al. // *Eur J. Surg Oncol.* – 2016. – Vol. 42(11). – P. 1680-1686.

176. Møller, P. Cancer incidence and survival in Lynch syndrome patients receiving colonoscopic and gynaecological surveillance: first report from the prospective Lynch syndrome database / P. Møller, T. Seppälä, I. Bernstein et al. // *Gut.* - 2017. – Vol. 66(3). – P. 464-472.

177. Møller, P. Cancer risk and survival in *path_MMR* carriers by gene and gender up to 75 years of age: a report from the Prospective Lynch Syndrome Database / Møller, P., T.T. Seppälä, I. Bernstein et al. // *Gut.* – 2018. – Vol. 67(7). – P. 1306–1316.

178. Montagnani, F. Progression-free Survival as a Surrogate End-point in Advanced Colorectal Cancer Treated with Antiangiogenic Therapies / F. Montagnani, G. Leonardo, M.S. Pino et al. // *Anticancer Res.* – 2016. - Vol. 36(8). – P. 4259-4265.

179. Moreira, L. Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer / L. Moreira, F. Balaguer F, N. Lindor et al. // *JAMA.* – 2012. – Vol. 308(15). – P. 1555-1565.

180. Müller, M.F. Molecular pathological classification of colorectal cancer / M.F. Müller, A.E. Ibrahim, M.J. // *Virchows Arch.* – 2016. – Vol. 469(2). – P. 125-134.

181. Muranen, T.A. Patient survival and tumor characteristics associated with CHEK2:p.I157T - findings from the Breast Cancer Association Consortium / T.A. Muranen, C. Blomqvist, T. Dörk et al. // *Breast Cancer Res.* – 2016. – Vol. 18(1). – P. 98.

182. Myers, E.A. Colorectal cancer in patients under 50 years of age: a retrospective analysis of two institutions' experience / E.A. Myers, D.L. Feingold, K.A. Forde KA et al. // *World J. Gastroenterol.* – 2013. – Vol. 19(34). – P. 5651-5657.

183. Nam, S.K. BRAF, PIK3CA, and HER2 Oncogenic Alterations According to KRAS Mutation Status in Advanced Colorectal Cancers with Distant Metastasis / S.K. Nam, S. Yun, J. et al. // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11(3). - e0151865.

184. National Comprehensive Cancer Network [Электронный ресурс]. –

Режим

доступа:

https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_colon.pdf

185. National Comprehensive Cancer Network. Clinical practice guidelines in oncology. Colon cancer. Version I.2018 – January 18, 2018. [Электронный ресурс]. –

Режим доступа: <https://www.nccn.org/professionals/>.

186. Nicolaides, N.C. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer / N.C. Nicolaides, N. Papadopoulos, B. *9 et al. // Nature. – 1994. – Vol. 371(6492). – P. 75-80.

187. Nieuwenhuis M.H. Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): A review of the literature / M.H. Nieuwenhuis, H.F.A. Vasen // Critical Reviews in Oncology/Hematology. – 2007. – Vol. 61. – P. 153–161.

188. Niu, W. Correlation between microsatellite instability and RAS gene mutation and stage III colorectal cancer / W. Niu, G. Wang, J. Feng et al. // Oncology letters. – 2019. – Vol. 17. – P. 332-338.

189. Noone, A. SEER Cancer Statistics / A. Noone, N. Howlader, M. Krapcho et al. // Review, 1975–2015 Bethesda, MD. - 2018.

190. Nordlinger, B. Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver. A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. Association Française de Chirurgie / B. Nordlinger, M. Guiguet, J.C. Vaillant et al. - Cancer. – 1996. Vol. 77(7). - P. 1254-1262.

191. Nowak, M.A. The role of chromosomal instability in tumor initiation / M.A. Nowak, N.L. Komarova, A. Sengupta et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2002. – Vol. 21. – P. 21.

192. O'Brien, M.J. et al. Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points / M.J. O'Brien, S. Yang, C. Mack et al. // Am. J. Surg. Pathol. – 2006. – Vol. 30. – P. 1491–1501.

193. Ogino, S. LINE-1 hypomethylation is inversely associated with

microsatellite instability and CpG island methylator phenotype in colorectal cancer / S. Ogino, T. Kawasaki, K. Nosho et al. // *Int. J. Cancer.* – 2008. – Vol. 122. – P. 2767–2773.

194. Ogino, S. Molecular classification and correlates in colorectal cancer / S. Ogino, A. Goel // *J. Mol. Diagn.* – 2008. – Vol. 10(1). – P. 13-27

195. Palmer, M.L. Colorectal adenocarcinoma in patients less than 40 years of age / M.L. Palmer, L. Herrera, N.J. Petrelli // *Dis. Colon Rectum.* – 1991. – Vol. 34(4). – P. 343-346.

196. Palomaki, G.E. EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome / G.E. Palomaki, M.R. McClain, S. Melillo et al. // *Genet. Med.* – 2009. – Vol. 11(1). – P. 42-65.

197. Papp, J. Contribution of APC and MUTYH mutations to familial adenomatous polyposis susceptibility in Hungary / J. Papp, M.E. Kovacs, Z. Matrai et al. // *Fam. Cancer.* – 2016. – Vol. 15(1). – P. 85-97.

198. Parau, A. Determinants of survival after liver resection for metastatic colorectal carcinoma / A. Parau, N. Todor, L. Vlad // *J BUON.* – 2015. – Vol. 20(1). – P. 68-77.

199. Parry, S. Metachronous colorectal cancer risk for mismatch repair gene mutation carriers: the advantage of more extensive colon surgery / S. Parry, A.K. Win, B. Parry et al. // *Gut.* – 2011. – Vol. 60. – P. 950–957.

200. Passiglia, F. Can KRAS and BRAF mutations limit the benefit of liver resection in metastatic colorectal cancer patients? A systematic review and meta-analysis / F. Passiglia, G. Bronte, V. Bazan et al. // *Crit Rev Oncol Hematol.* – 2016. – Vol. 99. – P. 150-157.

201. Passot, G. ASO Author Reflections: RAS Mutations in Metastatic Colorectal Cancer / G. Passot, J.N. Vauthey, Y.S. Chun // *Ann Surg Oncol.* – 2018. – Vol. 25(Suppl 3). – P. 850-851.

202. Patel, S.G. Colorectal Cancer in the Young / S.G. Patel, D.J. Ahnen // *Curr. Gastroenterol. Rep.* - 2018. - Vol. 20(15). - P. 2-11.

203. Pearlman, R. Prevalence and Spectrum of Germline Cancer Susceptibility Gene Mutations Among Patients With Early-Onset Colorectal Cancer / R. Pearlman, W.L. Frankel, B. Swanson et al. // *JAMA Oncol.* – 2017. – Vol. 3(4). – P. 464-471.
204. Peeters, M. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as secondline treatment in patients with metastatic colorectal cancer / M. Peeters, T.J. Price, A. Cervantes et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28. – P. 4706–4713.
205. Peeters, M. Massively parallel tumor multigene sequencing to evaluate response to panitumumab in a randomized phase III study of metastatic colorectal cancer / M. Peeters, K.S. Oliner, A. Parker et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2013. – Vol. 19(7). – P. 1902-1912.
206. Pérez-Cabornero, L. Genotype–phenotype correlation in MMR mutation-positive families with Lynch syndrome / L. Pérez-Cabornero, M. Infante, E. Velasco et al. // *International Journal of Colorectal Disease.* – 2013. – Vol. 28(9). – P. 1195–1201.
207. Pino, M.S. The chromosomal instability pathway in colon cancer / M.S. Pino, D.C. Chung // *Gastroenterology.* – 2010. – P. 138. – P. 2059–2072.
208. Phipps, A.I. Association Between Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and Patient Survival / A.I. Phipps, P.J. Limburg, J.A. Baron et al. // *Gastroenterology.* – 2015. – Vol. 148. – P. 77–87.
209. Plawski, A. APC gene mutations causing familial adenomatous polyposis in Polish patients / A. Plawski, R. Slomski // *J. Appl. Genet.* – 2008. – Vol. 49(4). – P. 407-414.
210. Popat, S. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis / S. Popat, R. Hubner, R.S. Houlston // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – Vol. 23. – P. 609–618.
211. Primrose, J. Lung metastasectomy in colorectal cancer: is this surgery effective in prolonging life? J. Primrose, T. Treasure, F. Fiorentino // *Respirology.* – 2010. – Vol. 15(5). – P. 742-746.
212. Puccini, A. Impact of Patient Age on Molecular Alterations of Left-

Sided Colorectal Tumors / A. Puccini, H.J. Lenz, J.L. Marshall et al. // *Oncologist*. – 2019. – Vol. 24(3). – P. 319-326.

213. Prediction of DNA mismatch repair gene mutation status in incident colorectal cancer cases [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://hnpccpredict.hgu.mrc.ac.uk/>.

214. PREMM. Lynch syndrome prediction model [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://premm.dfci.harvard.edu/>.

215. Raedle, J. Bethesda guidelines: relation to microsatellite instability and MLH1 promoter methylation in patients with colorectal cancer / J. Raedle, J. Trojan, A. Brieger et al. // *Ann. Intern. Med.* – 2001. – Vol. 135(8 Pt 1). – P. 566-576.

216. Rajagopalan, H. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status / A. Bardelli, C. Lengauer, K.W. Kinzler et al. // *Nature*. – 2002. – Vol. 418(6901). – P. 934.

217. Rebersek, M. Molecular biomarkers and histological parameters impact on survival and response to first-line systemic therapy of metastatic colorectal cancer patients / M. Rebersek, T. Mesti, M. Boc et al. // *Radiol. Oncol.* – 2019. – Vol. 53(1). – P. 85-95.

218. Rees, M. Evaluation of long-term survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: a multifactorial model of 929 patients / M. Rees, P.P. Tekkis, F.K. Welsh et al. // *Ann Surg.* – 2008. – Vol. 247(1). – P. 125-135.

219. Richards, S. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology / S. Richards, N. Aziz, S. Bale et al. // *Genet. Med.* – 2015. – Vol. 17(5). – P. 405–424.

220. Richman, S.D. KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial / S.D. Richman, M/T/ Seymour, P. Chambers et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 27(35). – P. 5931-5937.

221. Ripa, R. De novo mutations in familial adenomatous polyposis (FAP) / R. Ripa, M.L. Bisgaard, S. Bülow et al. // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2002. – Vol. 10(10). – P.

631-637.

222. Roberts, T.G. The phase III trial in the era of targeted therapy: Unraveling the “go or no go” decision / T.G. Roberts, T.J. Lynch, B.A. Chabner // *J. Clin. Oncol.* – 2003. – Vol. 21. – P. 3683-3695.

223. Robson, M.E. American Society of Clinical Oncology Policy Statement Update: Genetic and Genomic Testing for Cancer Susceptibility / M.E. Robson, A.R. Bradbury, B. Arun et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2015. – Vol. 33(31). – P. 3660-3667.

224. Rodriguez, J. Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers / J. Rodriguez, J. Frigola, E. Vendrell et al. // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66. – P. 8462–9468.

225. Roepman, P. Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition / P. Roepman, A. Schlicker, J. Taberero et al. // *Int. J. Cancer.* – 2014. – Vol. 134. – P. 552-562.

226. Roger, L. Extensive telomere erosion in the initiation of colorectal adenomas and its association with chromosomal instability / L. Roger, R.E. Jones, N.H. Heppel et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2013. – Vol. 105. – P. 1202–1211.

227. Rohlin, A. Expanding the genotype-phenotype spectrum in hereditary colorectal cancer by gene panel testing / A. Rohlin, E. Rambech, A. Kvist et al. // *Fam Cancer.* – 2017. – Vol. 16(2). – P. 195-203.

228. de Roock, W. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis / W. De Roock, B. Claes, D. Bernasconi et al. // *Lancet Oncol.* – 2010. – Vol. 11(8). – P. 753-762.

229. Rossi B.M. A survey of the clinicopathological and molecular characteristics of patients with suspected Lynch syndrome in Latin America / B.M. Rossi, E.I. Palmero, F. López-Kostner et al. // *BMC Cancer.* – 2017. – Vol. 17. – P. 623.

230. Saad, E.D. Statistical controversies in clinical research: end points other than overall survival are vital for regulatory approval of anticancer agents / E.D. Saad, M. Buyse // *Ann. Oncol.* – 2016. – Vol. 27(3). – P. 373–378.

231. Sadanandam, A. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy / A. Sadanandam, C.A. Lyssiotis, K. Homicsko et al. // *Nat. Med.* – 2013. – Vol. 19(5). – P. 619-625.
232. Saeed, O. RAS genes in colorectal carcinoma: pathogenesis, testing guidelines and treatment implications / O. Saeed, A. Lopez-Beltran, K.W. Fisher et al. // *J. Clin. Pathol.* – 2019. – Vol. 72. – P. 135–139.
233. Sahin, I.H. Rare Though Not Mutually Exclusive: A Report of Three Cases of Concomitant KRAS and BRAF Mutation and a Review of the Literature / I.H Sahin, S.M.A. Kazmi, J. T. Yorio et al. // *Journal of Cancer.* – 2013. - Vol. 4. – P. 320-322.
234. Samara, M. Mutation profile of KRAS and BRAF genes in patients with colorectal cancer: association with morphological and prognostic criteria / M. Samara, K. Kapatou, M. Ioannou et al. // *Genet. Mol. Res.* – 2015. - Vol. 14 (4). – P. 16793-16802.
235. Sameer, A.S. Mismatch repair pathway: molecules, functions, and role in colorectal carcinogenesis / A.S. Sameer, S. Nissar, K. Fatima // *Eur. J. Cancer Prev.* - 2014. – Vol. 23(4). – P. 246-257.
236. Samowitz, W. S. APC Mutations and Other Genetic and Epigenetic Changes in Colon Cancer / W.S. Samowitz, M.L. Slattery, C. Sweeney et al. // *Molecular Cancer Research.* – 2007. – Vol. 5(2). – P. 165–170.
237. Sargent, D.J. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracilbased adjuvant therapy in colon cancer / D.J. Sargent, S. Marsoni, G. Monges et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28. – P. 3219-3226.
238. Schirripa, M. BRAF and RAS mutations as prognostic factors in metastatic colorectal cancer patients undergoing liver resection / M. Schirripa, F. Bergamo, C. Cremolini et al. // *Br J Cancer.* – 2015. – Vol. 112(12). – P. 1921-1928.
239. Schwark, A.L. Pan-cancer microsatellite instability to predict for presence of Lynch syndrome / A.L. Schwark, P. Srinivasan, Y. Kemel et al. // *Journal of Clinical Oncology* 36(18_suppl):LBA1509-LBA1509.
240. Senter, L. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations / L. Senter, M. Clendenning, K. Sotamaa et al. // *Gastroenterology.* -

2008. – Vol. 135(2). – Vol. 419-428.

241. Seth, R. Concomitant mutations and splice variants in KRAS and BRAF demonstrate complex perturbation of the Ras/Raf signalling pathway in advanced colorectal cancer / R. Seth, S. Crook, S. Ibrahim et al. // *Gut*. – 2009. – Vol. 58. – P. 1234–1241.

242. Shi, Q. Individual patient data analysis of progression free survival versus overall survival as a first-line end point for metastatic colorectal cancer in modern randomized trials: findings from the analysis and research in cancers of the digestive system database / Q. Shi, A. de Gramont, A. Grothey et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2015. – Vol. 33(1). – P. 22–28.

243. Shida, D. Shorter survival in adolescent and young adult patients, compared to adult patients, with stage IV colorectal cancer in Japan / D. Shida, Y. Ahiko, T. Tanabe et al. // *BMC Cancer*. – 2018. – Vol. 18(1). – P. 334.

244. Shindoh, J. KRAS mutation status predicts site-specific recurrence and survival after resection of colorectal liver metastases irrespective of location of the primary lesion / J. Shindoh, Y. Nishioka, R. Yoshioka et al. // *Ann Surg Oncol*. – 2016. – Vol. 23. – P. 1890-1896.

245. Silla, I.O. Early-onset colorectal cancer: a separate subset of colorectal cancer / I.O. Silla, D. Rueda, Y. Rodríguez et al. // *World J Gastroenterol*. – 2014. – Vol. 20(46). – P. 17288-17296.

246. Singh H. Underdiagnosis of Lynch Syndrome Involves More than Family History Criteria Hardeep / H. Singh, R. Schiesser, G. Anand et al. // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* – 2010. – Vol. 8(6). – P. 523–529.

247. Sinicrope, F. A. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy / F.A. Sinicrope, N.R. Foster, S.N. Thibodeau et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2011. – Vol. 103. – P. 863-875.

248. Sinicrope, F.A. Analysis of Molecular Markers by Anatomic Tumor Site in Stage III Colon Carcinomas from Adjuvant Chemotherapy Trial NCCTG N0147 (Alliance) / F.A. Sinicrope, M.R. Mahoney, H.H. Yoon et al. // *Clin. Cancer Res.* –

2015. – Vol. 21. – P. 5294–5304.

249. Sinicrope, F.A. Molecular Biomarkers in the Personalized Treatment of Colorectal Cancer / F.A. Sinicrope, K. Okamoto, P. M. Kasi et al. // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* – 2016. – Vol. 14(5). – P. 651–658.

250. Sithanandam, G. Complete coding sequence of a human B-raf cDNA and detection of B-raf protein kinase with isozyme specific antibodies / G. Sithanandam, W. Kolch, F.-M. Duh et al. // *Oncogene.* – 1990. – Vol. 5. – P. 1775-1780.

251. Soliman, A.S. Colorectal cancer in Egyptian patients under 40 years of age /

A.S. Soliman, M.L.Bondy, B. Levin et al. // *Int. J. Cancer.* – 1997. – Vol. 71(1). – P. 26-30.

252. de Sousa E Melo, F. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions / F. De Sousa E Melo, X. Wang, M. Jansen et al. // *Nature Medicine.* – 2013. - Vol. 19. – P. 614–618.

253. Spring, K.J. High prevalence of sessile serrated adenomas with BRAF mutations: a prospective study of patients undergoing colonoscopy / K.J. Spring, Z.Z. Zhao, R. Karamatic et al. // *Gastroenterology.* – 2006. – Vol. 131. – P. 1400–1407.

254. Stadler, Z.K. Reliable Detection of Mismatch Repair Deficiency in Colorectal Cancers Using Mutational Load in Next-Generation Sequencing Panels / Z.K. Stadler, F. Battaglin, S. Middha et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2016. – Vol. 34(18). – P. 2141-7.

255. Stoffel, E.M. Germline Genetic Features of Young Individuals With Colorectal Cancer / E.M. Stoffel, E. Koeppe, J. Everett et al. // *Gastroenterology.* – 2018. – Vol. 154(4). – P. 897-905.

256. Suzuki, H. IGFBP7 is a p53-responsive gene specifically silenced in colorectal cancer with CpG island methylator phenotype /H. Suzuki, S. Igarashi, M. Nojima et al. // *Carcinogenesis.* – 2010. – Vol. 31. – P. 342–349.

257. Szabo, C. Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine-beta-synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer / C. Szabo, C. Coletta, C. Chao et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* - 2013. –

Vol. 110. – P. 12474-12479.

258. Tahara, T. Colorectal carcinomas with CpG island methylator phenotype 1 frequently contain mutations in chromatin regulators / T. Tahara, E. Yamamoto, P. Madireddi et al. // *Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 146. – P. 530–538. e5.

259. Tempero, M.A. Serum and hair selenium levels in hereditary nonpolyposis colorectal cancer / M.A. Tempero, M.M. Jacobs, H.T. Lynch et al. // *Biol. Trace Elem. Res.* – 1984. – Vol. 6(1). – P. 51-55.

260. Teng, A. Patterns and outcomes of colorectal cancer in adolescents and young adults / A. Teng, D.Y. Lee, J. Cai et al. // *J. Surg. Res.* – 2016. – Vol. 205(1). – P. 19-27.

261. Testa, U. Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor progression, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells // U. Testa, E. Pelosi, G. Castelli // *Med. Sci. (Basel)*. – 2018. – Vol. 6(2). pii: E31.

262. Tezcan, G. Molecular approach to genetic and epigenetic pathogenesis of early-onset colorectal cancer / G. Tezcan, B. Tunca, S. Ak et al. // *World J. Gastrointest. Oncol.* – 2016. – Vol. 15(8). – P. 83-98.

263. Thanki, K. Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and their Clinical Implications / K. Thanki, M.E. Nicholls, A. Gajjar et al. // *Int. Biol. Biomed. J.* – 2017. – Vol. 3(3). – P. 105-111.

264. Therkildsen, C. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis / C. Therkildsen, T.K. Bergmann, T. Henrichsen-Schnack et al. // *T. Acta Oncol.* – 2014. – Vol. 53(7). – P. 852-864.

265. Thutkawkorapin, J. Exome sequencing in 51 early onset non-familial CRC cases / J. Thutkawkorapin, A. Lindblom A², E. Tham // *Mol. Genet. Genomic Med.* – 2019. - e605.

266. Tie, J. KRAS mutation is associated with lung metastasis in patients with curatively resected colorectal cancer / J. Tie, L. Lipton, J. Desai et al. // *Clin Cancer Res.* – 2011. – Vol. 17(5). – P. 1122-1130.

267. Tiwari, A.K. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives /

A.K. Tiwari, H.K. Roy, H.T. Lynch // QJM. – 2016. – Vol. 109(3). – P. 151-158.

268. Tol, J. Markers for EGFR pathway activation as predictor of outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with or without cetuximab / J. Tol, J.R.Dijkstra, M. Klomp et al. // Eur. J. Cancer. – 2010. – Vol. 46(11). – P. 1997-2009.

269. Torsello, A. P53 and bcl-2 in colorectal cancer arising in patients under 40 years of age: distribution and prognostic relevance / A. Torsello, C. Garufi, M. Cosimelli et al. // Eur. J. Cancer. – 2008. – Vol. 44(9). – P. 1217-1222.

270. Tran, B. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer / B. Tran, S. Kopetz, J. Tie et al. // Cancer. – 2011. – Vol. 117(20). – P. 4623-4632.

271. Umar, A. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability / A. Umar, C.R. Boland, J.P. Terdiman et al. // J. Natl. Cancer Inst. – 2004. – Vol. 96. – P. 261–268.

272. Ustaalioglu, O.B.B. Prognostic markers for metastatic colon cancer patients undergoing multiple metastasectomies / Ö.B.B. Ustaalioglu, M. Tilki, Z.G. Kılıçoğlu et al. // Turk J Gastroenterol. – 2015. – Vol. 26(5). – P. 386-391.

273. Vasen, H.F. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC / H.F. Vasen, P. Watson, J.P. Mecklin et al. // Gastroenterology. – 1999. – Vol. 116(6). – P. 1453-1456.

274. Venderbosch, S. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies / S. Venderbosch, I.D. Nagtegaal, T.S. Maughan et al. // Clin. Cancer Res. – 2014. – Vol. 20(20). – P. 5322-5330.

275. Vittal, A. Are All Mutations the Same? A Rare Case Report of Coexisting Mutually Exclusive KRAS and BRAF Mutations in a Patient with Metastatic Colon Adenocarcinoma / A. Vittal, A. Middinti, A. Kasi Loknath Kumar // Case Rep. Oncol. Med. – 2017. – e. 2321052.

276. Vogelstein, B. Genetic alterations during colorectal-tumor development /

B. Vogelstein, E.R. Fearon, S.R. Hamilton et al. // *N. Engl. J. Med.* – 1988. – Vol. 319(9). – P. 525-532.

277. Wang, L. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair / L. Wang, J.M. Cunningham, J.L. Winters et al. // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63. – p. 5209–5212.

278. Walsh, T. Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing / T. Walsh, M.K. Lee, S. Casadei et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2010. – Vol. 107(28). – P. 12629-12633.

279. Walther, A. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis / A. Walther, R. Houlston, I. Tomlinson // *Gut.* - 2008. – Vol. 57. – P. 941–950.

280. Walther, A. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer / A. Walther, E. Johnstone, C. Swanton et al. // *Nat. Rev. Cancer.* – 2009. – Vol. 9. – P. 489–499.

281. Watson, R. High frequency of KRAS mutation in early onset colorectal adenocarcinoma: implications for pathogenesis / R. Watson, T.C. Liu, M.B. Ruzinova // *Hum. Pathol.* – 2016. – Vol. 56. – P. 163-170.

282. Weisenberger, D.J. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer / D.J. Weisenberger, K.D. Siegmund, M. Campan et al. // *Nat. Genet.* - 2006. – Vol. 38. – P. 787–793.

283. Willauer, A.N. Clinical and molecular characterization of early-onset colorectal cancer / A.N. Willauer, Y. Liu, A.A.L. Pereira et al. // *Cancer.* – 2019. – Epub ahead of print.

284. Willett, W.C. Diet and cancer: An evolving picture / W.C. Willett // *JAMA.* – 2005. – Vol. 293. – P. 233–234.

285. Win, A.K. Risk of breast cancer in Lynch syndrome: a systematic review / A.K. Win, N.M. Lindor, M.A. Jenkins et al. // *Breast Cancer Research.* – 2013. – Vol. 15. – R. 27.

286. Win, A.K. Risk of colorectal cancer for carriers of mutations in MUTYH,

with and without a family history of cancer / A.K. Win, J.G. Dowty, S.P. Cleary et al. // *Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 146(5). – P. 1208-11.e1-5.

287. Wojas-Krawczyk, K. Analysis of KRAS, NRAS, BRAF, and PIK3CA mutations could predict metastases in colorectal cancer: A preliminary study / K. Wojas-Krawczyk, E. Kalinka-Warzocho, K. Reszka et al. // *Adv. Clin. Exp. Med.* - 2019. – Vol .28(1). – P. 67–73.

288. Yaeger, R. BRAF mutation predicts for poor outcomes after metastasectomy in patients with metastatic colorectal cancer / R. Yaeger, A. Cercek, J.F. Chou et al. // *Cancer*. – 2014. – Vol. 120. – P. 2316-2324.

289. Yaeger, R. Clinical Sequencing Defines the Genomic Landscape of Metastatic Colorectal Cancer / R. Yaeger, W.K. Chatila, M.D. Lipsyc et al. // *Cancer Cell*. – 2018. – Vol. 33(1). – P. 125-136.e3.

290. Yamaguchi, T. Long-Term Outcome of Metachronous Rectal Cancer Following Ileorectal Anastomosis for Familial Adenomatous Polyposis / T. Yamaguchi, S. Yamamoto, S. Fujita et al. // *Journal of Gastrointestinal Surgery*. – 2009. - Vol. 14(3). – P. 500–505.

291. Yang, Y. Prognostic value of the combination of microsatellite instability and BRAF mutation in colorectal cancer / Y. Yang, D. Wang, L. Jin et al. // *Cancer Manag. Res.* – 2018. – Vol. 10. – P. 3911-3929.

292. Yanus, G.A. Spectrum of APC and MUTYH germ-line mutations in Russian patients with colorectal malignancies / G.A. Yanus, T.A. Akhapkina, A.O. Ivantsov et al. // *Clin. Genet.* – 2018. – Vol. 93(5). – P. 1015-1021.

293. Yeo, H. Early-onset Colorectal Cancer is Distinct From Traditional Colorectal Cancer / H. Yeo, D. Betel, J.S. Abelson et al. // *Clin. Colorectal Cancer*. – 2017. – Vol. 16(4). – P. 293-299.

294. Yilmazlar, T. Colorectal cancer in young adults / T. Yilmazlar, A. Zorluoğlu, H. Ozgüç et al. // *Tumori*. – 1995. – Vol. 81(4). – P. 230-233.

295. Yokota, T. BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer / T. Yokota, T. Ura, N. Shibata et al. // *Br. J. Cancer*. – 2011. – Vol. 104(5). – P. 856-862.

296. Yokoyama, S. Survival after initial lung metastasectomy for metastatic colorectal cancer in the modern chemotherapeutic era / S. Yokoyama, M. Mitsuoka, T. Kinugasa et al. // *BMC Surg.* – 2017. – Vol. 17(1). – P. 54.

297. Yoon, H.H. KRAS codon 12 and 13 mutations in relation to disease-free survival in BRAF-wild-type stage III colon cancers from an adjuvant chemotherapy trial (N0147 alliance) / H.H. Yoon, D. Tougeron, Q. Shi et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2014. – Vol. 20. – P. 3033–3043.

298. Young, J. Serrated pathway colorectal cancer in the population: genetic consideration / J. Young, M. Jenkins, S. Parry et al. // *Gut.* – 2007. – Vol. 56(10). – P. 1453–1459.

299. Yothers, G. Toward Progression-Free Survival As a Primary End Point in Advanced Colorectal Cancer / G. Yothers // *J. Clin. Oncol.* – 2007. – Vol. 25(33). – P. 5153-5154.

300. Yurgelun, M.B. Cancer susceptibility gene mutations in individuals with colorectal cancer / M.B. Yurgelun, M.H. Kulke, Fuchs C. S. et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2017. – Vol. 35(10). – P. 1086–1095.

301. Zhang, J. Development and validation of nomograms for prediction of overall survival and cancer-specific survival of patients with Stage IV colorectal cancer / J. Zhang, Z. Gong, Y. Gong et al. // *Japanese Journal of Clinical Oncology.* – Vol. 49(5). – 2019. – P. 438–446.

302. Zlobec, I. Clinicopathological and protein characterization of BRAF- and K-RAS-mutated colorectal cancer and implications for prognosis / I. Zlobec, M.P. Bihl, H. Schwarb et al. // *Int. J. Cancer.* – 2010. - Vol. 127. – P. 367–380.

303. Zoratto, F. Focus on genetic and epigenetic events of colorectal cancer pathogenesis: implications for molecular diagnosis / F. Zoratto, L. Rossi, M. Verrico et al. // *Tumour Biol.* – 2014. – Vol. 35(7). – P. 6195-6206.