

О.В. Покітко², О.М. Сулаєва¹, А.О. Машуков^{2,3}, С.В. Мерліч², О.М. Згура², Д.В. Раціборський², І.В. Шилін², О.В. Шкурат², В.М. Сирбу², М.А. Петросян², Б.С. Юхимчук², В.В. Брайловська³, І.Г. Летінський², Б.Ю. Брайловський³

Взаємозв'язок спеціальних молекулярних механізмів при колоректальному раку. Огляд наукової літератури

¹Медична лабораторія CSD LAB, Київ, Україна

²Комуніальне некомерційне підприємство «Одеський регіональний клінічний протипухлинний центр» Одеської обласної ради», Одеса, Україна

³Міжнародний гуманітарний університет, Одеса, Україна

DOI: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.54-2.32793

Сучасна онкологія є цариною, що швидко розвивається, використовує все більш складні й багаторівневі моделі для опису процесів, що відбуваються в пухлині. Від розуміння «простої» колонії злоякісних клітин ми спочатку перейшли до розуміння неоднорідності процесів, що відбуваються в різних її частинах, до усвідомлення значної ролі «зпсованої» пухлинної генетики. Одним із найбільш яскравих і добре вивчених є генетика колоректального раку (КРР), формуванню якої передують ціла низка подій. Теоретичні моделі, що характеризують появу специфічного онкологічного фенотипу, вважаються доволі добре розробленими. Але, як виявилось, події, що відбуваються у процесі накопичення ознак злоякісного зростання, не мають лінійного характеру. Вони швидше накопичуються паралельно, та це відбувається з різними швидкостями. Зміни накопичуються поступово, а реалізуються стрибкоподібно. Найбільш яскравим прикладом цього, з погляду авторів публікації, є порівняння 2 ліній мутацій: драйверних, що входять у так званий фулл-хаус (Full House; Vogelgram), і, відповідно, набору мутацій, що не входять до нього. До перших належать *APC*, *DCC*, *TP 53*, *KRAS* та гіпометилювання ДНК, до других — *PIK3CA*, *BRAF*, *NRAS*, *HER2*, *PTEN*, *STAT3*, *RAF1*. Замість одного, який раніше вважався «провідним» фенотипом — мікросателітної нестабільності (Microsatellite instability — MSI), виступає другий, конкуруючий фенотип метилатора CpG-острівців (CpG island methylator phenotype — CIMP). У цьому огляді ми спробували прояснити спрямованість зазначених тенденцій, усвідомити їхню роль у біології та механізмах розвитку КРР.

Ключові слова: біоінформатика; колоректальний рак; пухлинна генетика; мікросателітна нестабільність; мутаційне навантаження пухлини; мікрооточення; біологія пухлини; пухлинна імуногенність; молекулярні шляхи; фенотип пухлини; інтегроміка; секвенування наступного покоління; мультигеномні панелі.

КРР — гетерогенне захворювання з різними передбачуваними прогностичними біомаркерами [2].

Останніми роками відмічається прогрес у розумінні механізмів його розвитку [4, 7, 20]. Найчастіше ці механізми асоціюються з молекулярними поломками, що виникають у всьому геномі, призводячи до появи майже завжди одних і тих самих сценаріїв (феномен Конрада Уодлінгтона). Коли, незважаючи на існування потенційно нескінченної кількості різноманітних варіантів розвитку подій, щоразу реалізується 2–4 найбільш «біологічно усталених» варіанти. Набір мікроскопічних внутрішньоклітинних поломок, що реалізуються при КРР, у такий спосіб «вмикає» так званий фулл-хаус, і в такому разі йдеться про статистично випадкове «випадання» комбінацій одних і тих же мутацій: *APC*, *DCC*, *TP 53*, *KRAS* та гіпометилювання ДНК. Правильний набір цих стійких комбінацій (а точкові мутації, як відомо, повинні відбутися в обох аелях вище наведених генів одночасно) можливий виключно внаслідок ще більш масштабної епігенетичної поломки: розвитку так званої генетичної та/або хромосомної нестабільності; якій, своєю чергою, спочатку передують ще низка деяких базових сценаріїв. КРР проявляє різні основні молекулярні зміни із 2 основними механізмами генетичної нестабільності: хромосомною та MSI [4, 9, 16]. Новоявлена здатність до агрегації «поломок» призводить до збільшення багатогранності ситуації, появи нової біології КРР: модуляції імуногенності, лавиноподібного накопичення помилок — пухлинного мутаційного навантаження (tumor mutation burden — TMB) [25], (хоча частину цих генетичних помилок накопичено «протопухлиною» значно раніше, що й призвело до збігу компонентів пазла фулл-хауса), вторинного мутагенезу. Найбільш імуногенні пухлини пов'язують з іншою, що не входить до Vogelgram [21], мутацією — *BRAF* [5, 19, 23], найменш — з *PIK3CA*. Як і раніше, вважається, що КРР з мутацією *BRAF* (протоонкоген *B-Raf*, серин / треонінова кіназа) має несприятливий прогноз [7, 20]. Кіназа *BRAF* є ниж-

чою в сигнальному каскаді мішенню *KRAS*, що активує шлях MAPK. Ці дві молекули схильні до мутацій при спорадичних MSI колоректальних карциномах [4, 8], а мутації *BRAF V600E* пов'язані з онкогенними мутаціями *KRAS*. Біологічне значення онкогенної активації *BRAF V600E* для цієї пухлини не встановлено. Мутації *BRAF*, *KRAS* та *PIK3CA* часто виявляються при спорадичному КРР [2, 13, 19, 23]. На відміну від мутацій *KRAS* та *PIK3CA*, мутації *BRAF* пов'язані з новоутвореннями, що несуть CIMP, метилювання *MLH1* та MSI.

КРР проявляється після накопичення генетичних та епігенетичних змін поряд із мікрооточенням пухлини. Морфологічно ж потенційна здатність пухлини трансформувати власне оточення оцінюється 2 прямими критеріями: наявністю експресії PD-L1 та ступенем її інфільтрації лімфоцитами та макрофагами [3, 15, 16, 20]. Як і 3 непрямими критеріями: наявністю підвищеного показника TMB, а також такими проявами нестабільного генома, що постійно флюктує, як MSI-h і dMMR (хоча деякі і вважають, що це те саме) [8]. Відновлення невідповідності (MMR) / MSI та TMB є «незалежними біомаркерами», які доповнюють один одного для прогнозування ефективності інгібіторів імунних контрольних точок (Immune Checkpoint Inhibitors — ICI). Дослідники все ще прагнуть розробити стратегію, яка поєднує визначення MSI та TMB для КРР в одному аналізі. Метою цього огляду є окреслити різні шляхи колоректального канцерогенезу та надати огляд останніх досягнень у системах молекулярної патологічної класифікації КРР.

Динаміка розвитку наукової ситуації навколо КРР складається з низки смислів. По-перше, КРР розвивається з 2 фенотипів: MSI та мікросателітно стабільного (Microsatellite stability — MSS) варіантів [4, 8]. По-друге, КРР тепер звичайно розподіляють на проксимальний і дистальний, замість більш раннього детального анатомічного розподілу, який звичайно ж зберігається. Останнім часом багато дослідників намагалися визначити молекулярну гетерогенність цього виду раку вздовж

ділянок кишечника. При цьому диференціальні ефекти CIMP та MSI на клінічний результат залежно від локалізації пухлини недостатньо відомі [9, 16].

СТВОРЕННЯ НОВИХ КЛАСИФІКАЦІЙ ТА ОНОВЛЕННЯ СТАРИХ

N. Papadimitriou та співавт. [18] у дослідженні 2024 р. використовували менделівську рандомізацію (Mendelian Randomization — MR) для вивчення потенційних причинно-наслідкових зв'язків між розмірами тіла (індексом маси тіла (ІМТ), окружністю талії та процентним вмістом жиру в організмі) з рівнем ризику розвитку різних типів КРР за класифікацією Джесса; аналізуючи також MSI — статуси MSI, CIMP, мутації *BRAF* та *KRAS*. Зведені дані молекулярних маркерів отримані від 2 генетичних консорціумів (CCFR, GECCO). Результати: виявлено, що підвищення рівня ІМТ на 1 стандартне відхилення ((СВ) 5, 1 кг/м²) підвищує ризик розвитку 1-го типу за Джессом: MSI-високий, CIMP-високий, *BRAF*-мутантний, *KRAS*-дикий тип; та 2-го типу за Джессом: невисокий MSI, високий CIMP, *BRAF*-мутантний, *KRAS*-дикий тип КРР (1-й та 2-й варіанти об'єднані в так званий зубчастий фенотип). Величина цих асоціацій була сильнішою порівняно з 4-м типом за Джессом: не-MSI-високим, CIMP-низким / негативним, *BRAF*-диким типом, *KRAS*-диким типом КРР (p -різниця 0,03 та 0,04 відповідно). Збільшення окружності талії на 1-СВ (13,4 см) підвищувало ризик розвитку синдрому Джесса 3-го типу: без MSI-високого, CIMP-низкого / негативного, *BRAF*-дикого типу та мутації *KRAS*, що було сильніше порівняно з КРР 4-го типу за Джессом (p -різниця 0,03). Вищий відсоток тілесного жиру (СВ 8,5%) підвищував ризик розвитку КРР 1-го типу за Джессом (2,59, 95% ДІ: 1,49, 4,48; значення $p=0,001$), що було вищим, ніж при КРР 4-го типу за Джессом (p -різниця 0,03). Інтерпретація: розмір тіла був більш тісно пов'язаний із «зубчастим» (1-м та 2-м типами за Джессом) та «альтернативним» (3-м типом за Джессом) шляхами колоректального канцерогенезу порівняно з «традиційним» способом (4-м типом за Джессом). КРР є гетерогенним захворюванням, яке може розвиватися 3 основними способами: звичайним, зубчастим і альтернативним (conventional, serrated, and alternate).

L. Wang та співавт. [24] прагнули з'ясувати, чи відрізняються профілі факторів ризику залежно від молекулярних підтипів, пов'язаних зі шляхами. Досліджувався зв'язок 24 факторів ризику з 4 молекулярними підтипами КРР на основі комбінованого статусу MSI, CIMP та мутації *BRAF* та *KRAS*. Зібрані дані з 2 великих когорт США, автори використали регресію пропорційних ризиків Коксу, зважену за ймовірністю, для оцінки диференціальних асоціацій між підтипами. Результати: зареєстровано 1175 пацієнтів з КРР з даними про молекулярні підтипи: підтип 1 ($n=498$; традиційний спосіб; не-MSI-високий, CIMP-низкий або негативний, *BRAF*-дикий тип, *KRAS*-дикий тип), підтип 2 ($n=138$; зубчастий спосіб; будь-який статус MSI, CIMP-високий, *BRAF*-мутований, *KRAS*-дикий тип, підтип 3 ($n=367$; альтернативний спосіб; мутований за *KRAS*) та підтип 4 ($n=172$; інші комбінації маркерів). Статистично значущу гетерогенність в асоціаціях з підтипами КРР виявлено для таких факторів, як вік, стать та куріння, при цьому вищий коефіцієнт ризику (risk ratio — RR) фіксувався для підтипу 2, ніж у інших підтипів КРР. Більш сильний зв'язок виявлений для показників ожиріння підтипу 1 у чоловіків та підтипу 3 у жінок, а також для кількох дієтичних факторів з підтипу 1, хоча ці відмінності не досягли статистичної значущості на рівні 0,005. Висновки. Профілі таких факторів ризику, як ожиріння та куріння, можуть відрізнятися для КРР, що виникає різними молекулярними шляхами.

СУЧАСНІ МУЛЬТИГЕНОМНІ ПАНЕЛІ

Відповідні дослідження знайшли через PubMed, обмежені оригінальними дослідженнями, опублікованими за останні 10 років. T. Lawler та співавт. у дослідницькій роботі [12] (2024) виявлено 96 статей, в яких порівнювалася поширеність харак-

теристик КРР, пов'язаних зі смертністю у осіб негроїдної раси з випадками смертей серед осіб європейської раси. Результати: пухлини у осіб негроїдної раси на близько 10% частіше містять мутації *KRAS*, які призводять до підвищеної смертності та стійкості до інгібування рецепторів епідермального фактора росту. І навпаки, у осіб негроїдної раси ймовірність розвитку пухлин з мутацією *BRAF* на близько 50% нижча і вони трапляються рідше, але аналогічно впливають на смертність і терапевтичну резистентність. Існують менш послідовні докази, що підтверджують відмінності в мутаціях інших онкогенів, включно з *PIK3CA*, *TP53*, *APC*, *NRAS*, *HER2* і *PTEN*, хоча більш високі показники мутацій *PIK3CA* і більш низька поширеність статусу MSI для випадків у осіб негроїдної раси підтверджуються. Хоча в нових даних встановлено, що імунні маркери, які відображають протипухлинний імунітет у мікротооченні пухлини, можуть бути нижчими у осіб негроїдної раси, недостатньо доказів для оцінки відмінностей в інших нових маркерах, ракових стовбурових клітинах, мікроРНК та узгоджених молекулярних підтипах.

>30% всіх випадків раку у людини зумовлені мутаціями *RAS*, а активуючі мутації *KRAS* наявні у 40% випадків КРР у 2 основних підгрупах: MSS та MSI. У дослідженнях новоутворень, викликаних *RAS*, зафіксовано важливу роль ефекторів *RAS*, *RAF* і, зокрема, *RAF1*, яка може залежати або не залежати від здатності *RAF* активувати модуль *MEK* / *ERK*. У дослідженні С. Dorard [4] в оригінальній дослідницькій роботі (2023) виявлено, що *RAF1*, але не його кіназна активність, відіграє вирішальну роль у проліферації сфероїдів клітинної лінії MSI та MSS, а також органодів, отриманих від пацієнта, та незалежно від статусу мутації *KRAS*. Більш того, ми могли б визначити транскриптомний підпис *RAF1*, який включає гени, що зумовлюють активацію *STAT3*, і зафіксувати, що абляція *RAF1* знижує фосфорилування *STAT3* у всіх сфероїдах КРР, що тестуються. Гени, що беруть участь в активації *STAT3*, а також мішені *STAT3*, що сприяють ангиогенезу, також були пригнічені в первинних пухлинах людини, які експресують низькі рівні *RAF1*. У цих результатах встановлено, що *RAF1* може бути привабливою терапевтичною мішенню як MSI, так і MSS КРР незалежно від їх статусу *KRAS*, і підтримують розробку селективних деградаторів *RAF1*, а не інгібіторів *RAF1* для клінічного використання в комбінованій терапії.

Хоча *SHP2* є перспективною мішенню для терапії раку, його зв'язок з вродженою імуносупресією залишається незрозумілим. Щоб розв'язати цю проблему, J. Gao та співавт. [6] у дослідженні (2022) проведено секвенування одноклітинної РНК, щоб вивчити роль *SHP2* у всіх типах клітин з ТМЕ з ксенотрансплантатів МС38 мишей. Виявлено, що внутрішньопухлинні клітини функціонально гетерогенні та значно реагують на *SHP099*, алостеричний інгібітор *SHP2*. Злоякісна «еволюція» пухлинних клітин ефективно зупинена за допомогою *SHP099*. Механістично опосередковану *STING*-*TBK1*-*IRF3* передачу сигналів інтерферону типу I було значно активовано *SHP099* в інфільтрованих мієлоїдних клітинах. Примітно, що у пацієнтів з КРР з фенотипом MSS відмічалася більш виражена інфільтрація макрофагів та більш потужне фосфорилування *SHP2* РНК у макрофагах *CD68+*, ніж у осіб із підвищеним рівнем MSI, що вказує на потенційну роль макрофагального *SHP2* при ТМЕ. У сукупності за допомогою наших даних розкрито механізм вродженої імуносупресії, опосередкований *SHP2*, який дозволяє припустити, що *SHP2* є перспективною мішенню для імунотерапії раку товстої кишки.

A. Preto та співавт. [19] прагнули вивчити ефекти проліферації та виживаності, індуковані інгібуванням *BRAF* у клітинних лініях MSI, що мають різну генетичну основу (*BRAF* V600E або *KRAS* G13D). Пригнічення *BRAF* у клітинних лініях *BRAF* V600E MSI за допомогою РНК-інтерференції значно інгібувало проліферацію та індукувало апоптоз, як зафіксовано при включенні BrdU та аналізі TUNEL відповідно. Жодних суттєвих відмінностей у проліферації та апоптозі

в клітинних лініях, що несуть KRAS G13D, після інгібування BRAF не відмічалось. Далі проаналізовано молекули, пов'язані з проліферацією (pERK1/2, циклін D1, p27 Kip1), та молекули, пов'язані з апоптозом (Bcl-2, Вах, pAkt, pBad, XIAP) у всіх клітинних лініях. Після зниження регуляції BRAF ми виявили більш виражене зниження рівнів фосфорилування ERK1/2 та експресії цикліну D1 у клітинних лініях з мутацією BRAF порівняно з клітинами з мутацією KRAS. При інгібуванні BRAF ми також виявили підвищення рівня p27 (Kip1) та більш виражене зниження рівня антиапоптозного білка Bcl-2, особливо у клітинних лініях із BRAF V600E. На закінчення ми встановили, що клітинні лінії KPP, мутантні MSI KRAS і BRAF по-різному реагують на нокдаун BRAF.

КРР ЯК КЛОНДАЙК НОВИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ КЛАСИФІКАЦІЙ

Найкраще прогрес у практичному розумінні КРР проявляється у спробах створення нових молекулярних класифікацій, які спираються на яскравість його біології. Нещодавній консорціум «Консенсусні молекулярні підтипи» (Consensus Molecular Subtypes — CMS), що аналізує дані профілю експресії КРР з кількох досліджень, охарактеризував 4 групи CMS: майже всі гіпермутовані види раку MSI потрапили до першої категорії CMS1 (MSI-імунні, 14%), а інші види раку, MSS, розподілені на 3 групи. CMS2 (канонічний, 37%), CMS3 (метаболічний, 13%) та CMS4 (мезенхімальний, 23%) із залишковою неklasифікованою групою (змішані ознаки, 13%). Хоча для підтвердження цих двох систем необхідні подальші дослідження, вони можуть бути корисними для дизайну клінічних досліджень і майбутніх рішень про ад'ювантне післяопераційне лікування, особливо для пухлин з агресивними характеристиками або прогнозованою реакцією на блокаду ICI [14].

Але на цьому прогрес не зупиняється. Наприклад, існує класифікація Джасса за окремими підтипами КРР, враховуючи всю обговорювану нами сьогодні групу: MSI-статус, статус CIMP, мутації BRAF та KRAS. Типи за Джасом наведені нижче. 1-й: MSI-високий, CIMP-високий, BRAF-мутантний, KRAS-дикий тип. 2-й тип за Джасом: невисокий MSI, високий CIMP, BRAF-мутантний, KRAS-дикий тип КРР. 3-й тип за Джасом: без MSI-високого, CIMP-низького / негативного, BRAF-дикого типу та мутації KRAS. 4-й тип за Джасом: не-MSI-високий, CIMP-низький / негативний, BRAF-дикий тип, KRAS-дикий тип КРР [18], як йшлося вище.

Нещодавно запропоновано 2 молекулярно-патологічні системи класифікації КРР. Комплексний молекулярний аналіз у межах проєкту «Атлас геному раку» (The Cancer Genome Atlas — TCGA) ґрунтується на широкомасштабному дослідженні геномних та транскриптомних характеристик КРР з використанням технологій масивів та секвенування. За цим підходом КРР класифікується на 2 основні групи відповідно до попередніх класифікаційних систем [14]: 1) ~16% гіпермутованих випадків новоутворень або з MSI через дефектну репарацію невідповідностей (~13%), або ультрамутованих пухлин з мутаціями, коригуючими ДНК-полімеразу епсілон (~3%); та 2) ~84% негіпермутованих MSS новоутворень з високою частотою змін кількості соматичних копій ДНК, в яких встановлено поширені мутації в APC, TP53, KRAS, SMAD4 та PIK3CA [3, 9, 14, 17, 22].

АНАЛІЗ МЕРЕЖІ ВИВАЖЕНОЇ СПІЛЬНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ (WEIGHTED GENE COEXPRESSION NETWORK ANALYSIS — WGCNA) ТА ІНТЕГРОМІКА

КРР частково зумовлений порушенням регуляції передачі сигналів Wnt, Ras-Raf-MAPK, TGF-β та PI3K-Akt. Прогресуванню КРР також сприяють молекулярні зміни та гетерогенні, але взаємопов'язані генні мутації, хромосомна нестабільність, транскриптомні підтипи та імунні сигнатури. Геномні зміни прогресування КРР призводять до змін експресії РНК, які підтримують метастазування. Система класифікації на основі

РНК, яка використовується для КРР, відома як «Консенсусне молекулярне підтипування» (Consensus Molecular Subtyping — CMS), як уже наведено вище, має 4 класи. CMS1 має найнижчий показник виживаності після рецидиву з 4 фенотипів CMS. Ідентифіковано сигнатури генів та пов'язані з ними кодуєчі мРНК, які спільно експресуються під час прогресування КРР CMS1. Використовуючи дані секвенування РНК зі зразків первинної пухлини КРР, отриманих з TCGA, ідентифікували мережі генів спільної експресії, що значно корелюють із прогресуванням CMS1 підтипу. Виявлено, що CXCL13, CXCR5, IL10, PIK3R5, PIK3AP1, CCL19 та інші спільно експресовані гени позитивно корелюють з CMS1. Коекспресовані власні генні мережі для CMS1 значно і позитивно корелювали із сигнальними шляхами TNF, Wnt, ERK1 та ERK2, які разом зумовлюють проліферацію та виживаність клітин. Ця мережа також відповідала біологічним характеристикам CMS1, позитивно корелюючи з правосторонніми пухлинами, MSI, хемокін-опосередкованими сигнальними шляхами та імунними відповідями. CMS1 також диференційно експресує гени, що беруть участь у передачі сигналів PI3K-Akt. У результатах S.K. Nunez та співавт. [17] встановлено, що генні мережі при КРР пов'язані з онкогенними сигнальними каскадами, активацією клітин та позитивною регуляцією імунних відповідей, що вирізняє CMS1 від інших підтипів КРР.

J.-F. Mosnier та співавт. [13] в оригінальному дослідженні (2022) зробили спробу прокартувати колоректальну карциному зі значною активацією сигнального шляху Wnt для визначення їх клініко-патологічних та молекулярних профілів. Виконане зіставлення ґрунтується на аналізі ієрархічної кластеризації серії з 283 КРР. У роботі представлені дані про гістопатологічні закономірності, імунотипову диференціацію, мутації RAS, RAF, CTNNB1 і статус MSI, пухлино-інфільтрувальних лімфоцитах (tumor-infiltrating lymphocytes — TIL) і генетичної схильності. Експресія бета-катеніну більш ніж у 10% усіх ядер клітин у центрі пухлини є сурогатним маркером значної активації сигнального шляху Wnt. Результати: експресія бета-катеніну в ядрах наявна у 95% всіх випадків КРР; 56% з них відповідали критеріям високого рівня експресії бета-катеніну в ядрах (≥10%). Частка бета-катенін-позитивних ядер була значно вищою у пацієнтів більш молодого віку з карциномами прямої кишки та лівою половинною товстої кишки. КРР з підвищеним рівнем експресії бета-катеніну в ядрах перегруповані в 3 кластери: 1) КРР MSS без конститутивної активації шляху MAPK, включно з 90% усіх аденокарцином низького ступеня злоякісності, без додаткового уточнення (not otherwise specified — NOS) гістологічної будови, з кишковим диференціюванням без TIL; 2) КРР MSS з мутацією RAS, зокрема аденокарциною низького ступеня злоякісності, NOS, з кишковим диференціюванням та муцинозною аденокарциною без TIL; 3) КРР MSI-H, включно з КРР з мутацією BRAF, що розвиваються зубчастим шляхом, і КРР з мутацією CTNNB1, пов'язані із синдромом Лінча.

АЛЛЕЛЬНИЙ ДИСБАЛАНС АІ ТА КЛАСТЕРНИЙ АНАЛІЗ

Пухлинна тканина складається з гетерогенної популяції клітин. T. Sugai та співавт. [22] опублікували роботу (2017), в якій спробували проаналізувати коефіцієнт алельного дисбалансу (Allelic Imbalance — AI), який визначається в ізольованих пухлинних залозах, є хорошим показником гетерогенності пухлини. Однак про зв'язок характеру розвитку АІ та MSI, що відмічається в більшості випадків КРР, з прогресуванням пухлини раніше не повідомлялося. У цій роботі проаналізовано, чи сприяють генетичні профілі КРР, стратифіковані комбінацією співвідношення АІ та MSI, і чи пов'язані ці генетичні профілі зі специфічними молекулярними змінами в цьому виді пухлин. Метод виділення крипт використаний для виділення ДНК з пухлин та нормальних залоз, отриманої зі 147 спорадичних КРР. Статус АІ та MSI встановлювали за допомогою мікросателітного

аналізу на базі ПЛР та стратифікували на основі співвідношення AI та статусу MSI. Досліджено статус метилювання ДНК (ви-сокий, проміжний та низький, а також мутації у *KRAS*, *BRAF* та *TP53*). Крім того, імунологічно забарвлювалися маркери муцину. На підставі цього аналізу виділено 4 підгрупи. Підгрупа 1 характеризувалася високим статусом MSI та мутацією *BRAF*; підгрупа 2 була тісно пов'язана з високим співвідношенням AI, яке накопичувалося на ранніх стадіях колоректального канцерогенезу, та мутацією *TP53*; підгрупа 3 пов'язана з низьким співвідношенням AI, що фіксується на пізніших фазах колоректального канцерогенезу, та мутація *KRAS*, а підгрупу 4 визначено як мінорну підгрупу. У цих результатах доведено, що класифікація різних молекулярних профілів надає важливу інформацію про колоректальний канцерогенез.

НАЙБІЛЬШ ПЕРЕДОВИМИ БУЛИ ДОСЛІДЖЕННЯ, ПРОВЕДЕНІ ЗА ДОПОМОГОЮ СЕКВЕНУВАННЯ ТРЕТЬОГО ПОКОЛІННЯ ТА РНК-АНАЛІЗУ

Ефективність інгібітора *BRAF* непередбачувана через внутрішню генетичну складність, імунне мікросередовище та частково — через наявність досі невідомих нам причин. Розуміння механізму комутації може допомогти покращити стратегію лікування та подальшого спостереження. У. Huang та співавт. [7] у дослідженні, опублікованому у 2024 р., ретроспективно проаналізували 35 (мутований *BRAF* / дикий тип *BRAF*) КРР у осіб монголоїдної раси та 125 КРР — європейської, які пройшли секвенування наступного покоління (Next Generation Sequencing — NGS). У цьому дослідженні охоплено аналіз спільних мутацій, збагачення шляху Gene Ontology (GO) та Кіотської енциклопедії генів та геномів (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes — KEGG). Результати: у 35 (10,32%) пацієнтів встановлено мутацію *BRAF*, з них 17 хворих проаналізували *BRAF* V600E в лікарні Пекіна. Особи з мутацією *BRAF* мали значний зв'язок з підвищенням пухлинним мутаційним навантаженням (ТМБ-Н) ($p=0,0004$) та високою MSI-Н ($p=0,0003$), ніж пацієнти з *BRAF* дикого типу. У 125 хворих європейської раси із КРР із мутацією *BRAF* за MSI, ТМБ відповідали таким даним у осіб монголоїдної раси. Однак за локалізацією первинної пухлини виявлено значні статистичні відмінності ($p < 0,0001$). Клас 1 частіше траплявся у пацієнтів похилого віку і жінок. Інші клініко-патологічні особливості були значно пов'язані з типом мутації. Водночас у даних зафіксовано, що ТМБ-Н (57,69% проти 11,76%, $p < 0,001$) і MSI-Н (28,21% проти 0%, $p < 0,05$) частки мутацій *BRAF* 1-го класу були значно вищими порівняно з класом 3 мутацій *BRAF*. При одночасних онкогенних мутаціях, порівняно з мутацією *BRAF*, що не належить до класу 1, цей клас частіше виявляється разом із мутацією-пасажиrom. У даних осіб європейської раси зафіксовані аналогічні результати. Ми також виявили, що мутація класу 1 була взаємовиключною з мутацією *co-KRAS* (гомолог вірусного онкогену саркоми шкура Кірстен) при КРР, а мутація *co-APC* (adenomatous polyposis coli APC-регулятор сигнального шляху Wnt) частіше розвивалася при мутації *BRAF*, що не належить до класу 1. У шляху KEGG виявлено, що менша кількість сигнальних шляхів протораку збагачена класом 1: це додатково підтвердило, що такий тип має вищу туморогенність. Клас 1 має більш високу онкогенність. Нарешті, у прогностичному аналізі зафіксовано, що медіана загальної виживаності становила 19,43 міс у класі 1 проти 47,57 міс у групі, що не належить до класу 1 ($p=0,0002$). У подальшому дослідженні встановлено, що показник медіани загальної виживаності класів 1–3 та класу «NA» (невідомо) становив 19,43, 28,50, 47,57 міс і не досягався ($p=0,0001$) відповідно.

Д. Хіао та співавт. [25] у дослідженні 2021 р. проаналізували за допомогою NGS хірургічні зразки або зразки біопсії, ретроспективно зібрані у пацієнтів з КРР. Імуногістохімія (ІГХ) і полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) також використовувалися для визначення MMR/MSI у тих, у кого для цього достатньо тканин. Метод NGS-MSI був перевірений за допомогою ІГХ

та ПЛР. Групи MSI-high (MSI-H), як і MSS, додатково стратифіковані на основі ТМБ з подальшою перевіркою з використанням набору даних TCGA. Імунне мікрооточення оцінювали для кожної підгрупи за профілем експресії імунних сигнатур. Результати: тканини 430 пацієнтів з КРР проаналізовані з використанням панелі NGS із 381 гена. Зміни у *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* та *HER2* виявлялися значно частіше серед пухлин MSI-H, ніж у пацієнтів із MSS (83,6% проти 58,4%, $p=0,0003$). Підмножина, що складається з 98 пухлин, протестована на MSI/MMR з використанням всіх 3 методів, де NGS виявився на 99,0 і 93,9% точнішим щодо ПЛР та ІГХ відповідно. 4 з 7 дискордантних випадків ІГХ-ПЛР мали низький рівень ТМБ (1,1–8,1 мутацій / МБ) і підтверджено, що за допомогою ІГХ встановлено неправильний діагноз. Цікаво, що 4 із 66 пухлин MSS (за даними NGS) визначені як ТМБ-high (ТМБ-Н) з використанням порогового значення 29 mut/Mb. Аналогічно 15 із 456 пухлин MSS у когорті TCGA також були ТМБ-Н з пороговим значенням 9 мутацій / Mb. Завдяки експресії імунних сигнатур у підгрупах (MSS-ТМБ-Н, MSI-H-ТМБ-Н та MSS-ТМБ-Л) зафіксовано, що мікрооточення пухлин MSS-ТМБ-Н аналогічне мікрооточенню MSI-Н. Пухлини ТМБ-Н значно більш імунореактивні, ніж пухлини MSS-ТМБ-Л, що вказує на те, що MSI поєднано з ТМБ може бути більш точним, ніж один MSI для прогнозування імунного мікрооточення.

Н. Kubota та співавт. [10] у дослідженні 2020 р. встановили, що молекули мікроРНК (міРНК / світ) відіграють вирішальну роль у прогресуванні різних типів раку, а рівень їхньої експресії часто є важливим діагностичним, прогностичним або тераностичним біомаркером. Метою цього дослідження було оцінити потенціал мікроРНК як прогностичних біомаркерів для пацієнтів з розвиненим КРР. Масиви мікроРНК виконані на зразках КРР, отриманих з пухлин з різним молекулярним статусом (наприклад протоонкоген *KRAS*, протоонкоген *GTPase (KRAS) / B-Raf*, серин / треонінова кіназа (*BRAF*) / MSI та їх парні слизової оболонки. У масиві мікроРНК зафіксовано, що міР-31-5p (світ-31) специфічно активується в КРР з мутацією *BRAF V600E*, результати якого підтверджені подальшим аналізом набору даних, отриманих з бази даних TCGA, яка містила інформацію про 170 пацієнтів із КРР, зокрема 51 — з КРР та мутацією *BRAF*. У когорті з 67 хворих з КРР IV стадії у 15 (22%) та 4 (6%) виявлено мутації *KRAS* та *BRAF V600E* відповідно. Оскільки медіана експресії міР-31 становила 3,45 (діапазон 0,004–6330,531), граничне значення обрано рівним 3,5, і всі пухлини розподілені на 2 групи відповідно (висока / низька експресія міР-31). Група з високою експресією міР-31 ($n=33$) значно пов'язана з нижчою смертністю (одномірний $RR=2,12$; 95% довірчий інтервал (ДІ) 0,23–0,95; $p=0,03$) але в ній зафіксовано більш короткий медіанний час виживаності (median survival time (MST) 20,1 міс) порівняно з групою з низькою експресією міР-31 ($n=34$) (MST 38,3 міс; $p=0,03$), що вказує на те, що міР-31 є перспективним прогностичним біомаркером для пацієнтів з розвиненим КРР. Так, проведення функціонального аналізу експресії міР-31 може сприяти розробці нових методів таргетного лікування різних генетичних підтипів КРР.

ІМУНОФЕНОТИПУВАННЯ БУЛО НЕ МЕНШ ЗНАЧУЩЕ, НІЖ NGS

Імунна відповідь має важливе клінічне значення при КРР як щодо сприятливості прогнозу, так і для прогнозу наявності потенційної відповіді на імунотерапію [3, 11, 15, 19, 16, 20]. Клінічна значущість та прогностична цінність ТІЛ як взаємодії між злоякісними клітинами та імунною функцією відомі вже кілька десятиріч. Цей потенціал може бути різним для субпопуляцій Т-лімфоцитів, наділених різними функціями. Хоча шільність ТІЛ є прогностичною та тераностичною при КРР, вплив генетики пухлини на імунобіологію КРР поки не з'ясований. Ідентифікація генетичних факторів, що впливають на імунотип пухлини, необхідна для підвищення ефективності підходів стратифікованої імунотерапії.

Наявність пухлиноасоційованих імунних клітин допомагає передбачити результат і спрогнозувати виживаність пацієнтів при KPP та інших видах онкопатології. Кількісне визначення клітин на основі просторового цифрового аналізу зображень підвищує інформативну потужність, що забезпечується особливостями мікрооточення пухлини, та сприяє створенню нових систем прогностичної оцінки.

Дослідження E. Nazemalhosseini-Mojarad та співавт. [15] проведено у 2019 р. з метою вивчення прогностичної цінності CD8⁺ TIL для виживаності осіб з KPP як незалежного фактора онкогенетичних особливостей пухлини. Проаналізовано 281 зразок тканини, фіксований формаліном та залитий парафіном, у пацієнтів з Ірану з KPP; оцінений щодо клінічних особливостей, включно з локалізацією пухлини, її стадією, ступенем диференціювання і муцинозними характеристиками. Потім з використанням стандартного імуногістохімічного методу автори досліджували зрізи новоутворення, підраховували та ідентифікували CD8⁺ TIL у 2 ділянках пухлини, зокрема внутрішньопухлинній (ITCIL TIL) та стромальній (S TIL). Прогностичне значення CD8⁺ TIL визначалося шляхом порівняння з такими параметрами, як діагностичний вік, стадія пухлини, ад'ювантна терапія, статус MSI, мутації *KRAS* та *BRAF*, сімейний анамнез та рівень виживаності. Результати. Наявність внутрішньопухлинних лімфоцитів, що інфільтрують пухлинні клітини (ITCIL), CD8⁺ лімфоцитів достовірно пов'язана з диференціюванням ($p=0,004$), стадією пухлини, вузла та метастазів (за класифікацією TNM) ($p=0,001$) та MSI ($p=0,05$). Водночас аналіз пацієнтів з KPP, заснований на рівні інфільтрації стромальних інфільтрувальних лімфоцитів (SIL), був статистично пов'язаний з локалізацією ($p=0,002$), стадією за TNM ($p<0,001$), метастазуванням ($p<0,001$) і мутацією 0,001 ($p=0,031$). Крім того, пухлини з більш концентрованим вмістом ITCIL CD8⁺ лімфоцитів мають сприятливий прогноз порівняно з пухлинами зі збідненим або помірним вмістом ITCIL CD8⁺ лімфоцитів.

R. Dienstmann та співавт. [3] у дослідженні 2019 р. провели комплексний ретроспективний біомаркерний аналіз прогностичних маркерів у нелікованих ад'ювантною хімотерапією (N=1656, хемонаївних) та лікованих (N=980) осіб з KPP II стадії (N=7). Визначено показники CMS та оцінено показники інфільтрації CD8⁺ цитотоксичних лімфоцитів (CytoLym) та рак-асоційованих фібробластів (Cancer-associated Fibroblast — CAF) на основі об'ємних транскриптомів пухлинної тканини (пакети CMSclassifier та MCPcounter R); побудовано стратифіковану багатоваріантну модель Кокса для оцінки безрецидивної виживаності (Disease Free Survival — DFS); розраховано відносну частку пояснених варіацій за кожним маркером: клініко-патологічний (ClinPath), геномний (Gen: мутації *MSI*, *BRAF* та *KRAS*) показники CMS, клітини мікрооточення (MicroCells: CytoLym+CAF). У багатоваріантних моделях лише ClinPath і MicroCells залишалися значущими прогностичними факторами, при цьому показники інфільтрації CytoLym та CAF покращували прогноз виживаності порівняно з іншими маркерами. Пояснена варіація для моделей DFS показників ClinPath, MicroCells, Gen та CMS4 становила 77, 14, 5,3 та 3,7% відповідно на стадії II; і 55,9, 35,1, 4,1 та 0,9% відповідно на III стадії. Пацієнти, чий пухлини мали підвищений рівень CytoLym / низький CAF, мали кращу DFS ніж інші групи. MSS пухлини мали найсильніший сигнал про підвищення результатів з високими показниками CytoLym; а несприятливий прогноз, пов'язаний із високими показниками CAF, обмежений III стадією захворювання.

J.H. Kim та співавт. [9] у дослідженні, опублікованому у 2021 р., провели ретроспективний аналіз 73 первинних тканин MSI-H KPP, щоб охарактеризувати гетерогенні імунні підгрупи. На основі комбінованої імунооцінки TIL та активності третиної лімфоїдної структури (TLS) MSI-H колоректальні карциноми розподілені на підгрупи з високим імунітетом, проміжним імунітетом та низьким імунітетом. З них підгрупи з високим та низьким імунітетом були додатково проаналізовані

з використанням секвенування всього екзома та транскриптома. Автори виявили значні відмінності в імунних параметрах між KPP MSI-H і відповідним чином було виконано імунне групування KPP MSI-H. Щільність TIL та активність TLS у KPP MSI-H з низьким імунітетом порівняні з такими в підгрупі MSS KPP зі зниженим або проміжним імунітетом. Встановлено відмінності між KPP MSI-H осіб з підвищеним та зниженим імунітетом, включно з їх патологічними особливостями (медулярними та муцинозними), геномними змінами (злиттям тирозинкінази проти мутації *KRAS*) та активованими сигнальними шляхами (пов'язані з імунітетом порівняно з Wnt та Notch передачі сигналів), тоді як не виявлено суттєвих відмінностей у TMB та навантаженні неоантигенів. Зразки KPP осіб зі зниженим імунітетом MSI-H підрозподілені за консенсусним молекулярним підтипом (CMS1 проти CMS3) з різними характеристиками експресії генів (мезенхімальні / стеблеподібні проти епітеліальних / келихоподібних), що вказує на різні механізми ухилення від імунітету. Ангіогенез та CD200 ідентифіковані як потенційні терапевтичні мішені в KPP осіб зі зниженим імунітетом CMS1 та CMS3 MSI-H відповідно.

МУЛЬТИПЛЕКСНА ІМУНОГІСТОХІМІЯ ТА МУЛЬТИСПЕКТРАЛЬНА ВІЗУАЛІЗАЦІЯ

Використовувалася для оцінки інфільтрації пухлини цитотоксичними Т-клітинами (CD8⁺), клітинами Th₁ (T-bet⁺), Т-регуляторними клітинами (FoxP3⁺), В-клітинами (CD20⁺) та макрофагами (CD68⁺) у когорті з 257 пацієнтів з KPP [5]. Зафіксовано очікуваний зв'язок між вищою інфільтрацією імунних клітин та MSI. Крім того, якщо в пухлинах з мутацією *BRAF* встановлено підвищену інфільтрацію імунних клітин порівняно з пухлинами дикого типу *BRAF*, то протилежне відмічалось для пухлин з мутацією *KRAS*, причому відмінності були найбільш помітними для цитотоксичних Т-клітин і клітин Th₁. Протилежні зв'язки мутацій *BRAF* та *KRAS* з інфільтрацією пухлини цитотоксичними Т-клітинами підтверджені в незалежній когорті з 608 хворих із KPP. Позитивну прогностичну значущість цитотоксичних Т-клітин виявлено у KPP дикого типу, а також у KPP з мутаціями *KRAS* та *BRAF* в обох когортах.

A. Nestarenkaite [16] та співавт. у дослідженні 2020 р. оцінювали внутрішньопухлинну щільність імуногістохімічно забарвлених CD8, CD20 і CD68 клітин у 87 випадках KPP (48 були MSS, і 39 мали MSI). Показники градієнтів імунних клітин у вилученій тканині розраховані та досліджені разом з абсолютними щільностями клітин, клініко-патологічними та молекулярними даними, включно з геномною мутацією (*BRAF*, *KRAS*, *PIK3CA*) та статусом MSI. Множинне регресійне моделювання виявило ($p<0,0001$) 3 незалежні прогностичні фактори: CD8⁺ та CD20⁺. Імуноградієнтні показники, що відображають міграцію клітин у бік пухлини, пов'язані з підвищенням виживаності пацієнтів, тоді як інфільтративний характер росту пухлини пов'язаний з найгіршим результатом захворювання. Ці особливості об'єднані в бали CD8—CD20 імуноградієнта та імуноінтерфейсу, які переважали як прогностичний критерій стадії метастазування пухлинних вузлів (за TNM), так і молекулярні характеристики, і, що важливо, виявили високу прогностичну цінність як для MSS, так і для MSI KPP.

Рівень експресії PD-L1 у дослідженні Q. Qiu та співавт. [20] у 2024 р. не дозволив точно передбачити прогноз для хворих з поширеним KPP, але все ж певною мірою відображає склад мікрооточення пухлини. За допомогою стратифікації статусу PD-L1 проаналізовані підтипи генів у патологічних шляхах, пов'язаних з позитивністю PD-L1, щодо їх зв'язку з MSI або TMB, щоб забезпечити більш індивідуалізовані варіанти лікування KPP. Усього включено 752 поширених KPP, і їхню геномну варіабельність виміряно цільовою групою NGS в цьому дослідженні. MSI та TMB вимірювали за допомогою NGS, а рівень експресії PD-L1 — з використанням набору PD-L1 Colon 22C3 pharmDx. Ми виявили, що шлях RTK/RAS позитивно пов'язаний з високою експресією PD-

L1, при цьому BRAF V600E та більшість підтипів мутацій KRAS (G12 та G13) демонструють значну кореляцію. І навики, шляхи Wnt та p53 були негативно пов'язані з високою експресією PD-L1, при цьому зміни С-кінця APC та інші неінактивуючі мутації в TP53 робили основний внесок зі значною статистичною значущістю. Основні підтипи, при яких зафіксовано значно більшу частку TMB-H або MSI-H, були незалежні від статусу PD-L1. У цих результатах встановлено патологічні шляхи, пов'язані з підвищеною експресією PD-L1, що дозволяє припустити наступне: викликана у цей спосіб онкогенна конструктивна активація PD-L1 може слугувати причиною розвитку первинної резистентності відповідних пацієнтів до ICI, а не відсутністю попереднього регулювання PD-L1 в наявних імунних реакціях.

ЕВОЛЮЦІЯ BRAF, KRAS ТА PIK3CA У МУТАГЕНЕЗІ

Метою роботи S. Velho [23] було визначити частоту мутацій KRAS, BRAF та PIK3CA у процесі колоректального онкогенезу на прикладі низки колоректальних поліпів та карцином. У серії поліпів також вивчали CIMP, метилювання MLH1 та MSI. Методи: аналіз мутацій проводився за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) / секвенування. Оброблену бісульфітом ДНК використовували для вивчення метилювання CIMP та MLH1. MSI виявлений за допомогою пентаплексної ПЛР та аналізу квазімономорфних мононуклеотидних повторів GeneScan. Для проведення асоціативних досліджень використовувалися тест χ^2 -квадрат та точний критерій Фішера. Результати: KRAS, PIK3CA або BRAF трапляються у 71% усіх поліпів і є взаємовиключними. Мутації KRAS виявляють у 35% усіх поліпів. PIK3CA встановлено в одному з поліпів. Мутації V600E BRAF зафіксовано у 29% усіх випадків, вони класифікуються, як «зубчаста аденома». Фенотип CIMP траплявся у 25% усіх поліпів, усі мутанні за BRAF. Метилювання MLH1 не виявлено, і всі поліпи MSS. Порівняння частоти онкогенних мутацій у поліпах та KPP (MSI та MSS) дозволило нам встановити, що KRAS та PIK3CA, імовірно, передують обом типам KPP. Мутації BRAF, імовірно, передують карциномам MSI, оскільки частота, виявлена в зубчастих поліпах, аналогічна такій, виявленій при MSI KPP ($p=0,9112$), але статистично відрізняється від частоти, виявленої в MSS пухлинах ($p=0,0191$).

ВИДІЛЕННЯ ГІПЕРМУТОВАНИХ ПУХЛИН: ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК TMB ТА MSI-H

KPP з підвищеною мікросателітною нестабільністю (MSI-H) являє собою гіпермутовані пухлини і зазвичай вважається імуногенним. Однак їх гетерогенні імунні реакції і молекулярні характеристики, що лежать в їх основі, залишаються значною мірою незрозумілими. Наразі є, наприклад, невідомим, якою мірою групи консенсусних молекулярних підтипів (так звані генетичні варіанти KPP, CMS) KPP та патерни імуностромальної інфільтрації підвищують здатність прогнозувати результати залежно від стадії метастазування пухлинного вузла (за TNM) та стану MSI на ранніх стадіях KPP. J.M. Ває та співавт. [2] у 2013 р. проаналізували клініко-патологічні та молекулярні характеристики, включно з мутаціями CIMP, MSI, KRAS та BRAF, 734 випадків KPP відповідно до ділянок кишечника. Прогностичну цінність CIMP та MSI аналізували залежно від локалізації пухлини. Результати: виявлено лінійне збільшення переважання жінок, категорій T і N, стадії диференціювання, відсутність некрозу, TIL, лімфоїдної реакції типу Крона, зубчастості та продукції муцину від прямої до сліпої кишки. CIMP — високий та MSI-високий поступово підвищувався від прямої до сліпої кишки. CIMP є несприятливим прогностичним фактором загальної виживаності (RR 4,13; 95% ДІ 1,27–13,46) та безрецидивної виживаності (RR 2,90; 95% ДІ 1,04–8,08) при новоутворенні прямої кишки.

С.-Н. Jeon та співавт. [8] у корейському дослідженні 2008 р. зібрали 78 ракових тканин у пацієнтів з KPP. Генетичний аналіз проводили на APC, K-ras, p53 та MSI (BAT 25 та BAT 26), крім того, експресію MAGE перевіряли за допомогою ПЛР

зі зворотною транскрипцією. Кореляції між генетичними маркерами та клінічними факторами проаналізовані після вивчення медичних записів. Результат: позитивні показники змін APC, K-ras, p53, MSI та MAGE у 78 зразках тканин становили 33,3; 29,5; 34,6; 9,0 та 68,4% відповідно. Часто мутації виявлялися в кодонах №№ 1291 і 1450 APC, кодони № 12 K-ras і в кодонах №№ 248, 282 і 176 p53. Мутації APC часто відмічалися при раку на ранніх стадіях, тоді як MSI фіксувався при правосторонній та множинній онкопатології. Жодної асоціації між наявністю змін в APC, K-ras, p53, MSI та MAGE не виявлено. Інтерпретація: у осіб монголоїдної раси частота позитивних змін в APC та p53 була трохи нижчою, ніж у APC та p53 у осіб європейської раси, а генетичні зміни, зокрема експресія MAGE, залучені у 92,1% KPP. Відсутність множинних мутацій та зв'язок між частотою мутацій та клінічною стадією дозволяють припустити, що генетичні зміни можуть мати незалежний вплив на розвиток KPP у осіб монголоїдної раси.

У. Ап та співавт. [1] в оригінальній роботі 2021 р. виявили стосовно молекулярних характеристик, що при колоректальному перснеподібно-клітинному раку (КРППКР) мутаційний тягар класичних сигнальних шляхів, які включають сигнальні шляхи Wnt / β -катенін, RAS / RAF / MAPK та PI3K / AKT / mTOR, зазвичай знижений. Навпаки, деякі гени, пов'язані з процесом епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП) і властивостями стовбурових клітин, зокрема RNF43, CDH1 і SMAD4, а також пов'язаний з ним сигнальний шлях TGF- β , фіксувалися частіше зміненими при КРППКР, ніж при звичайній аденокарциномі. У багатьох дослідженнях у КРППКР зафіксовано більш високу частоту мутації BRAF, позитивний статус MSI-H та CIMP порівняно з аденокарциномою при KPP. Висловлено припущення, що КРППКР складається з двох підтипів, при яких гіперметилюваний генотип MSI+ / CIMP+ / BRAF+ / CD3+ / PD-L1+ найчастіше діагностувався в проксимальному відділі товстої кишки і міг бути потенційним кандидатом для імунотерапії. Розуміння особливих молекулярних механізмів, пов'язаних з агресивною біологією КРППКР, має велике значення і може забезпечити теоретичну основу розробки більш таргетних і ефективних методів лікування цього рефрактерного захворювання.

N. Lal та співавт. [11] у 2015 р. провели біоінформатичний аналіз даних KPP в TCGA з використанням двовимірної ієрархічної кластеризації для визначення імунної сигнатури, яку ми використовували для характеристики імунної відповіді у ключових групах пацієнтів. Імунна сигнатура, названа «Кластер координованої імунної відповіді» (Coordinate immune response cluster — CIRC), що включає 28 генів, координовано регулювалася у всій популяції хворих. На основі кластерної експресії виокремлено 4 групи пацієнтів. У групі А, в яку залучено велику кількість пацієнтів з MSI-H та мутаціями POL, встановлено підвищену експресію CIRC, включно з наявністю кількох молекул, що інгібують: CTLA4, PDL1, PDL2, LAG3 та TIM3. Мутація RAS, навпаки, частіше відмічалася у групах хворих з нижчою експресією CIRC. Ця робота пов'язує генетику та імунобіологію колоректального онкогенезу, що має значення для розробки стратифікованих імунотерапевтичних підходів. MSI і мутації KPP пов'язані з підвищеними TMB та імунною інфільтрацією, але координована експресія інгібуювальних шляхів, що виявляється, передбачає, що для підвищення ефективності може знадобитися комбінована терапія блокади контрольних точок.

РІДКІСНІ ТА СПЕЦІАЛЬНІ ТЕМИ В РОЗРІЗІ НОВОГО РОЗУМІННЯ KPP

Колоректальний перснеподібно-клітинний рак (КРППКР) — рідкісний [1] підтип KPP з унікальними характеристиками. Через обмеженість досліджень з цього питання все ще немає всебічного та глибокого розуміння цього підтипу. Підсумовувалися клініко-патологічні особливості та молекулярні характеристики КРППКР на основі огляду наукової літератури. Клінічно КРППКР асоціюється з молодим віком,

перевагою проксимальної ділянки, пізньою стадією пухлини, високими гістологічним ступенем G, частотою ураження лимфатичних вузлів, великою кількістю випадків перитонеального метастазування та значно несприятливішим прогнозом.

Особи негроїдної раси [12] мають найвищу смертність від KPP серед усіх расових груп у США, що може бути пов'язане з відмінностями в доступі до медичної допомоги або пізнішою стадією діагностики. У недавніх відомостях зафіксовано, що відмінності в характеристиках пухлин можуть лежати в основі відмінностей у смертності. Щоб підкреслити нещодавні результати та сфери для дослідження, ми завершили перший систематичний огляд расових відмінностей у прогностичних маркерах раку, зокрема клініко-патологічних маркерах, MSI, онкогенних мутаціях та нових маркерах, включно з раковими стовбуровими клітинами та імунними маркерами.

KPP є одним з видів онкопатології, захворюваність на який найбільш швидко зростає в Кореї [8], проте комплексного аналізу, що дозволяє припустити генетичну основу розвитку KPP, не проводилося. Досліджувалася наявність змін гена аденоматозного поліпозу coli (*APC*), Kirsten-ras (*K-ras*), *p53*, MSI та гена антигену меланоми (*MAGE*) при KPP, а також зіставили отримані результати з клінічними даними.

Ожиріння [18] позитивно пов'язане з більшістю молекулярних підтипів KPP; однак масштаби та причинно-наслідковий зв'язок цих асоціацій не з'ясовані. Сюрпризом стала чітка асоціація куріння з вищою захворюваністю на KPP.

ОБГОВОРЕННЯ

Отримані висновки можна сформулювати в такий спосіб. Останніми роками існує 8 блоків концентрації уваги дослідників навколо теми, що обговорюється: «мультигеномні панелі», «мікрооточення», «мікросателітна нестабільність», «пошук класифікацій», «альтернативні панелі», «секвенування наступного покоління», «мутаційне навантаження». При огляді через MedLine найбільш релевантних і високоцитованих статей роботи вдалося розподілити на 2 блоки: більш широко спрямовані, що містять більш широкий різноплановий рівень інтеркореляції між зазначеними 7 блоками; і більш вузько-спеціальні, присвячені одному чи кільком блокам умовної «великої сімки». До тем, що найбільш цитуються, ми віднесли: «мультигеномні панелі» [2, 4, 7, 8, 13, 19, 20, 23], «мікрооточення» [3, 11, 15, 16, 19, 20], «мікросателітна нестабільність» [4, 8, 9, 16], «пошук класифікацій» [3, 9, 14, 17, 22], до найменш — «альтернативні панелі» [1, 6, 12, 18], «секвенування наступного покоління» [10, 25], «мутаційне навантаження в пухлині» [25].

Виявилось, що блок, присвячений опису мікрооточення, містив такі попередні висновки. Інфільтрувальні внутрішньопухлинні клітини CD8-T-лімфоцитів як незалежний прогностичний фактор, що мають протипухлинну активність, судячи з їх сприятливого впливу на виживаність пацієнтів, потенційно можуть бути використані. Мутантні пухлини RAS «проорокують» відносно низькі імунну інфільтрацію та експресію інгібуючих молекул. У таких умовах блокада контрольних точок може виявитися менш ефективною, що наголошує на необхідності розробки нових стратегій для цієї групи осіб. У результатах доведено, що характер інфільтрації мікрооточення пухлини є потужним визначальним фактором ризику віддаленої дисемінації на ранній стадії KPP. Багатоваріантні моделі припускають, що прогностична цінність груп MSI та CMS багато в чому пояснюється патернами інфільтрації CytoLum та CAF. Спільна оцінка статусу MSI, мутаційного статусу *KRAS* та *BRAF*, а також імунної інфільтрації (цитотоксичних T-клітин) може дати важливу інформацію про прогноз та відповідь на імунотерапію при KPP.

Найбільш яскравими попередніми висновками, що є в блоці, присвяченому MSI, стали такі. Наведені докази, які підтверджують, що *BRAF* є гарною мішенню для терапевтичного втручання у пацієнтів зі спорадичним MSI KPP, які несуть активувальні мутації в *BRAF*, але не в *KRAS*. Підтверджено,

що мутації *BRAF* мають більш м'який онкогенний ефект порівняно з *KRAS*, і припускають, що мутантним колоректальним клітинам *BRAF* необхідно накопичувати додаткові епігенетичні зміни, щоб досягти повної трансформації та еволюціонувати в MSI KPP. Мутації *BRAF*, *KRAS* та *PIK3CA* розвиваються до злоякісної трансформації — ці онкогенні зміни є первинними генетичними подіями в колоректальному канцерогенезі. Крім того, виявлено, що мутації *BRAF* розвиваються у зв'язку з фенотипом CIMP у колоректальних зубчастих поліпах. У колоректальних зубчастих поліпах та MSI KPP фіксують однакову частоту мутацій *BRAF*. Аденокарцинома низького ступеня злоякісності MSS, NOS, з кишковим диференціюванням без TIL («криптоподібна аденокарцинома») може бути морфологічним очікуваним канонічним молекулярним підтипом KPP, що проявляється як виявлене молекулярне епітеліальне диференціювання та активація Wnt.

«Блок класифікацій» охопив лише 2 головні висновки-укладання. Клініко-патологічні та молекулярні профілі KPP поступово змінюються залежно від ділянки кишечника, а прогностичне значення CIMP різняться залежно від локалізації пухлини. KPP MSI-H імуннологічно гетерогенні незалежно від TMB. Незвичайні KPP MSI-H з низьким імунітетом характеризуються муцинозною гістологією, мутаціями *KRAS* та активацією Wnt / Notch і можуть бути розподілені на окремі підтипи експресії генів, включно з CMS4-подібними CMS1 і CMS3.

Попередні висновки мультигеномних панелей. Мутації *BRAF* при KPP мають значні відмінності в характеристиках спільної мутації, геномних маркерах та прогностичних показниках. Розуміння типів мутацій *BRAF* та механізму комутації сприятиме точному розумінню стратегій лікування та подальшого спостереження, а також розвитку точної терапії KPP у майбутньому.

Метод на основі панелі NGS є одночасно надійним та тканиннефективним для комплексної молекулярної діагностики KPP. Це також наголошує на важливості об'єднання інформації MSI та TMB для вимогливих пацієнтів з різним мікрооточенням.

Вища частота розвитку пухлин з мутацією *KRAS* в осіб негроїдної раси може сприяти відмінностям у смертності від KPP. Потрібна додаткова робота, щоб зрозуміти, чи лежать нові маркери, зокрема імунні клітини, в основі підвищеної смертності від KPP, що встановлюється у осіб негроїдної раси.

ВИСНОВКИ

1. Гіперметильований генотип MSI+ / CIMP+ / BRAF+ / CD3+ / PD-L1+ частіше трапляється в проксимальному відділі товстої кишки і може бути потенційним кандидатом для імунотерапії.

2. Мутації *KRAS* фіксують у 35% усіх поліпів. *PIK3CA* виявлено в одному з поліпів. Мутації *V600E BRAF* виявлено у 29% усіх випадків, вони класифікуються, як «зубчаста аденома». Фенотип CIMP відмічено у 25% усіх поліпів, вони мутовані за *BRAF*. Метильовання MLH1 не виявлено, усі поліпи були MSS.

3. Зафіксовано очікуваний зв'язок між вищою інфільтрацією імунних клітин та MSI. Крім того, у разі, якщо в пухлинах з мутацією *BRAF* встановлено підвищену інфільтрацію імунних клітин порівняно з пухлинами дикого типу *BRAF*, протилежне відмічалось для пухлин з мутацією *KRAS*, причому відмінності були найбільш помітними для цитотоксичних T-клітин і клітин Th₁. Протилежні зв'язки мутацій *BRAF* та *KRAS* з інфільтрацією пухлини цитотоксичними T-клітинами підтверджені на незалежній когорті з 608 пацієнтів із KPP.

4. Мутації *BRAF*, ймовірно, передують карциномі MSI, оскільки частота, виявлена в зубчастих поліпах, аналогічна частоті, зафіксованій при MSI KPP ($p=0,9112$), але статистично відрізняється від частоти, встановленої в MSS пухлинах ($p=0,0191$).

5. CIMP — високий та MSI-високий поступово підвищувався від прямої до сліпої кишки. CIMP є несприятливим прогностичним фактором загальної виживаності (RR 4,13;

95% ДІ 1,27–13,46) та безрецидивної виживаності (RR 2,90, 95% ДІ 1,04–8,08) при раку прямої кишки.

6. Мутації APC часто траплялися при раку на ранніх стадіях, тоді як MSI фіксується при правосторонній та множинній онкопатології. Жодної асоціації між наявністю змін в APC, KRAS, p53, MSI та MAGE не виявлено.

7. Пацієнти з мутацією BRAF мали значний зв'язок з ТМВ-Н ($p=0,0004$) та MSI-Н ($p=0,0003$), ніж пацієнти з BRAF дикого типу.

8. KRAS, PIK3CA або BRAF трапляються у 71% усіх поліпів і є взаємовиключними.

9. На відміну від мутацій KRAS та PIK3CA, мутації BRAF пов'язані з пухлинами, що несуть CIMP, метилювання MLH1 та MSI.

10. Мутації BRAF V600E асоційовані з онкогенними мутациями KRAS.

11. Ожиріння та паління впливає на молекулярний механізм розвитку КРР.

12. КРР є гетерогенним захворюванням, яке може розвиватися з основними способами: звичайним, зубчастим і альтернативним (conventional, serrated, and alternate).

13. Порівняння частоти онкогенних мутацій у поліпах та КРР (MSI та MSS) дозволило встановити, що KRAS та PIK3CA, ймовірно, передують обом типам КРР.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- An, Y., Zhou, J., Lin, G., Wu, H., Cong, L., Li, Y., ... Shi, W. (2021). Clinicopathological and Molecular Characteristics of Colorectal Signet Ring Cell Carcinoma: A Review. *Pathology and Oncology Research*, 27, 1609859. doi: 10.3389/pore.2021.1609859.
- Bae, J. M., Kim, J. H., Cho, N. Y., Kim, T. Y., & Kang, G. H. (2013). Prognostic implication of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancers depends on tumor location. *British Journal of Cancer*, 109(4), 1004–1012. doi: 10.1038/bjc.2013.430.
- Dienstmann, R., Villacampa, G., Sveen, A., Mason, M. J., Niedzwiecki, D., Nesbakken, A., ... Guinney, J. (2019). Relative contribution of clinicopathological variables, genomic markers, transcriptomic subtyping and microenvironment features for outcome prediction in stage II/III colorectal cancer. *Annals of Oncology*, 30(10), 1622–1629. doi: 10.1093/annonc/mdz287.
- Dorard, C., Madry, C., Buhard, O., Toifi, S., Diduch, S., Ratovomanana, T., ... Baccarini, M. (2023). RAF1 contributes to cell proliferation and STAT3 activation in colorectal cancer independently of microsatellite and KRAS status. *Oncogene*, 42(20), 649–1660. doi: 10.1038/s41388-023-02683-w.
- Edin, S., Gylling, B., Li, X., Stenberg, Å., Löfgren-Burström, A., Zingmark, C., ... Palmqvist, R. (2024). Opposing roles by KRAS and BRAF mutation on immune cell infiltration in colorectal cancer — possible implications for immunotherapy. *British Journal of Cancer*, 130(1), 143–150. doi: 10.1038/s41416-023-02483-9.
- Gao, J., Wu, Z., Zhao, M., Zhang, R., Li, M., Sun, D., ... Sun, Y. (2022). Allosteric inhibition reveals SHP2-mediated tumor immunosuppression in colon cancer by single-cell transcriptomics. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(1), 149–166. doi: 10.1016/j.apsb.2021.08.006.
- Huang, Y., Jia, W., Zhao, G., Zhao, Y., Zhang, S., Li, Z., & Wu, G. (2024). Clinical features and mutation analysis of class 1/2/3 BRAF mutation colorectal cancer. *Chinese Clinical Oncology*, 13(1), 3. doi: 10.21037/cco-23-117.
- Jeon, C. H., Lee, H. I., Shin, I. H., & Park, J. W. (2008). Genetic alterations of APC, K-ras, p53, MSI, and MAGE in Korean colorectal cancer patients. *International Journal of Colorectal Disease*, 23(1), 29–35. doi: 10.1007/s00384-007-0373-0.
- Kim, J. H., Seo, M. K., Lee, J. A., Yoo, S. Y., Oh, H. J., Kang, H., ... Kim, S. (2021). Genomic and transcriptomic characterization of heterogeneous immune subgroups of microsatellite instability-high colorectal cancers. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 9(12), e003414. doi: 10.1136/jitc-2021-003414.
- Kubota, N., Taniguchi, F., Nyuya, A., Umeda, Y., Mori, Y., Fujiwara, T., ... Nagasaka, T. (2020). Upregulation of microRNA-31 is associated with poor prognosis in patients with advanced colorectal cancer. *Oncology Letters*, 19(4), 2685–2694. doi: 10.3892/ol.2020.11365.
- Lal, N., Beggs, A. D., Willcox, B. E., & Middleton, G. W. (2015). An immunogenomic stratification of colorectal cancer: Implications for development of targeted immunotherapy. *Oncoimmunology*, 4(3), e976052. doi: 10.4161/2162402X.2014.976052.
- Lawler, T., Parlato, L., & Warren Andersen, S. (2024). Racial disparities in colorectal cancer clinicopathological and molecular tumor characteristics: a systematic review. *Cancer Causes & Control*, 35(2), 223–239. doi: 10.1007/s10552-023-01783-y.
- Mosnier, J. F., Airaud, F., Métairie, S., Volteau, C., Bezieau, S., & Denis, M. (2022). Mapping of colorectal carcinoma diseases with activation of Wnt/beta-catenin signalling pathway using hierarchical clustering approach. *Journal of Clinical Pathology*, 75(3), 168–175. doi: 10.1136/jclinpath-2020-207144.
- Müller, M. F., Ibrahim, A. E., & Arends, M. J. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv*, 469(2), 125–134. doi: 10.1007/s00428-016-1956-3.
- Nazemalhosseini-Mojarad, E., Mohammadpour, S., Torshizi Esafahani, A., Gharib, E., Larki, P., Moradi, A., ... Zali, M. R. (2019). Intratumoral infiltrating lymphocytes correlate with improved survival in colorectal cancer patients: Independent of oncogenetic features. *Journal of Cellular Physiology*, 234(4), 4768–4777. doi: 10.1002/jcp.27273.
- Nestarenkaite, A., Fadhil, W., Rasmussen, A., Susanti, S., Hadjimichael, E., Laurinaviciene, A., ... Laurinavicius, A. (2020). Immuno-Interface Score to Predict Outcome in Colorectal Cancer Independent of Microsatellite Instability Status. *Cancers (Basel)*, 12(10), 2902. doi: 10.3390/cancers12102902.
- Nunez, S. K., Young, C. D., Griffen, T. L., Ohandjo, A. Q., McKinney, L. P., Kopetz, S., & Lillard, J. W. Jr. (2021). Identification of Gene Co-Expression Networks Associated with Consensus Molecular Subtype-1 of Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*, 13(22), 5824. doi: 10.3390/cancers13225824.

20. Papadimitriou, N., Qu, C., Harrison, T. A., Bever, A. M., Martin, R. M., Tsilidis, K. K., ... Murphy, N. (2024). Body size and risk of colorectal cancer molecular defined subtypes and pathways: Mendelian randomization analyses. *EBioMedicine*, 101, 105010. doi: 10.1016/j.ebiom.2024.105010.

22. Preto, A., Figueiredo, J., Velho, S., Ribeiro, A. S., Soares, P., Oliveira, C., & Seruca, R. (2008). BRAF provides proliferation and survival signals in MSI colorectal carcinoma cells displaying BRAF(V600E) but not KRAS mutations. *Journal of Pathology*, 214(3), 320–327. doi: 10.1002/path.2295.

23. Qiu, Q., Tan, D., Chen, Q., Zhou, R., Zhao, X., Wen, W., ... Wang, M. (2024). Clinical implications of PD-L1 expression and pathway-related molecular subtypes in advanced Asian colorectal cancer patients. *American Journal of Cancer Research*, 14(2), 796–808. doi: 10.62347/FSSF9938.

24. Rao, C. V., & Yamada, H. Y. (2013). Genomic Instability and Colon Carcinogenesis: From the Perspective of Genes. *Frontiers in Oncology*, 3, 130. doi: 10.3389/fonc.2013.00130.

25. Sugai, T., Eizuka, M., Takahashi, Y., Fukagawa, T., Habano, W., Yamamoto, E., ... Suzuki, H. (2017). Molecular subtypes of colorectal cancers determined by PCR-based analysis. *Cancer Science*, 108(3), 427–434. doi: 10.1111/cas.13164.

26. Velho, S., Moutinho, C., Cirnes, L., Albuquerque, C., Hamelin, R., Schmitt, F., ... Seruca, R. (2008). BRAF, KRAS and PIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis? *BMC Cancer*, 8, 255. doi: 10.1186/1471-2407-8-255.

27. Wang, L., He, X., Ugai, T., Haruki, K., Lo, C. H., Hang, D., ... Song, M. (2020). Risk Factors and Incidence of Colorectal Cancer According to Major Molecular Subtypes. *JNCI Cancer Spectrum*, 5(1), pkaa089. doi: 10.1093/jncics/pkaa089.

28. Xiao, J., Li, W., Huang, Y., Huang, M., Li, S., Zhai, X., ... Zou, Y. (2021). A next-generation sequencing-based strategy combining microsatellite instability and tumor mutation burden for comprehensive molecular diagnosis of advanced colorectal cancer. *BMC Cancer*, 21(1), 282. doi: 10.1186/s12885-021-07942-1.

Relationship of special molecular mechanisms in colorectal cancer. Literature review

O.V. Pokitko², O.M. Sulayeva¹, A.O. Mashukov^{2,3}, S.V. Merlich², O.M. Zgura², D.V. Ratsiborskyi², I.V. Shilin², O.V. Shkurar², V.M. Syrbu², M.A. Petrosyan², B.S. Yukhymchuk², V.V. Brailovska², I.H. Letinsky², B.Y. Brailovskyi

¹CSD LAB Medical laboratory, Kyiv, Ukraine

²Municipal Non-Commercial Enterprise «Odesa Regional Clinical Antitumor Center» of the Odesa Regional Council, Odesa, Ukraine

³International Humanitarian University, Odesa, Ukraine

Modern oncology raises a rapidly developing specialty that uses increasingly complex and multi-level models in order to describe multiple processes occurring inside tumor surface. From the understanding of some «simple» colony of malignant cells, we first of all have been moved to understanding the heterogeneity of those processes occurring in its various parts to realizing the significant role of «corrupted» tumor genetics. One of the most vivid and well-studied is the genetics of colorectal cancer, the formation of which is preceded by series of scenarios. Theoretical models describing the appearance of a specific oncological phenotype are considered to be quite well developed. But, as it turned out, the events taking place in the process of accumulating signs of malignant growth do not have a linear-like character. They accumulate simultaneously, and its accumulation occurs at different speeds. «Changes accumulate gradually, and are implemented in leaps and bounds». The most vivid example of this, from the point of view of the authors of the publication, is a comparison of 2 lines of mutations: driver mutations, included in the so-called «Full House» (Vogelgram) and, accordingly, a set of mutations had been not included in it yet. The first point includes APC, DCC, TP 53, KRAS and DNA hypomethylation, the second — PIK3CA, BRAF, NRAS, HER2, PTEN, STAT3, RAF1. Instead of one, which was previously considered the «leading» phenotype — microsatellite instability (MSI), there raises a second, competing phenotype of CpG-island methylator (CIMP). In this review, we have tried to clarify the direction of those trends, to comprehend their role in the biology and mechanisms of the colorectal cancer progression.

Key words: bioinformatics; colorectal cancer; genetics; microsatellite instability; tumor mutation burden; microenvironment; biology; immunogenicity; molecular pathways; tumor phenotype; integromics; next-generation sequencing; multigenomic panels.