

Молекулярно-генетическая характеристика колоректального рака в зависимости от статуса микросателлитной нестабильности

К.А. Оганян¹, А.А. Мусаелян^{1,2}✉, a.musaelyan8@gmail.com, М.А. Котикова¹, С.В. Лапин¹, В.Д. Назаров¹, М.А. Беляев¹, А.А. Захаренко¹, С.В. Орлов^{1,2}

¹ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова; 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8

² Научно-исследовательский институт медицинской приматологии; 354376, Краснодарский край, с. Веселое, ул. Мира, д. 177

Резюме

Введение. Появление маркеров, определяющих выбор терапии при метастатическом колоректальном раке (КРР), привело к увеличению общей выживаемости. Оптимальная тактика лечения теперь учитывает как клинические, так и генетические характеристики опухоли.

Цель. Исследовать особенности мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* и амплификации *HER2* в зависимости от микросателлитной нестабильности (МСН) при КРР.

Материалы и методы. Исследование включало 400 больных КРР, которым определена МСН, мутации *BRAF*, *KRAS* и *NRAS*. МСН определялась фрагментным анализом, а мутации в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* – ПЦР в реальном времени. У 100 пациентов с отрицательным *RAS/BRAF* была определена амплификация *HER2*. Всем пациентам с МСН определялись транслокации *NTRK*. Данные о предоперационном уровне РЭА и СА19-9 получены у 185 пациентов.

Результаты и обсуждение. Распространенность МСН составила 6,8%. Распространенность мутаций *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* при КРР с МСН была равна 66,7%, а при КРР с отсутствием – 52,3%. У пациентов с МСН уровень РЭА был ниже, чем у МСН-отрицательных больных ($p = 0,0061$). Общая распространенность мутаций *KRAS* и *NRAS* составила 45% и 2,5%, общая распространенность мутации *BRAF* V600E – 5,8%, при этом она чаще встречалась в опухолях с МСН ($p < 0,0001$). Вне зависимости от МСН *BRAF*-положительные опухоли характеризовались правосторонней локализацией ($p < 0,0001$), категорией Т3–4 ($p = 0,013$), поражением лимфатических узлов ($p = 0,004$), канцероматозом ($p = 0,046$), высоким уровнем СА19-9 ($p = 0,014$). Амплификация *HER2* была обнаружена в 7% случаев с диким типом *RAS/BRAF* и была взаимосвязана с раком прямой кишки ($p = 0,044$), категорией Т3–4 ($p = 0,041$) и отдаленными метастазами ($p = 0,038$). Амплификаций *HER2* и транслокаций *NTRK* в случаях с МСН не было выявлено.

Заключение. КРР с МСН имеет более высокую распространенность мутаций в основных генах. КРР с мутацией *BRAF* V600E и амплификацией *HER2* имеет агрессивные клинико-морфологические параметры.

Ключевые слова: колоректальный рак, микросателлитная нестабильность, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *HER2*, *NTRK*

Для цитирования: Оганян К.А., Мусаелян А.А., Котикова М.А., Лапин С.В., Назаров В.Д., Беляев М.А., Захаренко А.А., Орлов С.В. Молекулярно-генетическая характеристика колоректального рака в зависимости от статуса микросателлитной нестабильности. *Медицинский совет*. 2022;16(9):139–146. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2022-16-9-139-146>.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Molecular genetic characteristics of colorectal cancer depending on the status of microsatellite instability

Karina A. Oganyan¹, Aram A. Musaelyan^{1,2}✉, a.musaelyan8@gmail.com, Maretta A. Kotikova¹, Sergey V. Lapin¹, Vladimir D. Nazarov¹, Mikhail A. Belyaev¹, Aleksandr A. Zakharenko¹, Sergey V. Orlov¹

¹ Pavlov First Saint Petersburg State Medical University; 6–8, Lev Tolstoy St., St Petersburg, 197022, Russia

² Research Institute of Medical Primatology; 177, Mira St., Veseloe Village, Krasnodar Region, 354376, Russia

Abstract

Introduction. The emergence of new markers that determine the choice of therapy for metastatic colorectal cancer (CRC) has led to an increase in overall survival. The optimal treatment tactics now take into account both clinical and molecular-genetic characteristics of the tumor.

Aim. Investigation of the features of the *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* mutations and amplification of the *HER2* gene depending on microsatellite instability (MSI) in CRC.

Materials and methods. The study included 400 patients with CRC. MSI, *BRAF* V600E mutation, mutations in the *KRAS* and *NRAS* genes was identified to them. MSI was determined by fragment analysis, and mutations in the *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* genes by real-time PCR. *HER2* amplification was determined in 100 patients with a negative *RAS/BRAF*. *NTRK* translocations were determined in all patients with MSI. Data on preoperative levels of CEA and CA19-9 were obtained from 185 patients.

Results and discussion. The prevalence of MSI was 6.8%. The prevalence of *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* mutations in CRC with MSI was 66.7%, and in CRC with MSS – 52.3%. In patients with MSI, the level of CEA was lower than in MSS ($p = 0.0061$). The overall prevalence of *KRAS* and *NRAS* mutations was 45% and 2.5%. The overall prevalence of the *BRAF* V600E mutation was 5.8% and was more common in MSI-positive tumors ($p < 0.0001$). Regardless of MSI, *BRAF*-positive tumors were characterized by right-sided localization ($p < 0.0001$), category T3–4 ($p = 0.013$), lymph node involvement ($p = 0.004$), carcinomatosis ($p = 0.046$), high levels of CA19-9 ($p = 0.014$). *HER2* amplification was found in 7% of wild-type *RAS/BRAF* cases and was associated with rectal cancer ($p = 0.044$), category T3–4 ($p = 0.041$), and distant metastases ($p = 0.038$). *HER2* amplifications and *NTRK* translocations were not detected in cases with MSI.

Conclusion. MSI-positive CRC had a higher prevalence of mutations in major genes. CRC with the *BRAF* V600E mutation and *HER2* amplification had aggressive clinical and morphological parameters.

Keywords: colorectal cancer, microsatellite instability, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *HER2*, *NTRK*

For citation: Oganyan K.A., Musaelyan A.A., Kotikova M.A., Lapin S.V., Nazarov V.D., Belyaev M.A., Zakharenko A.A., Orlov S.V. Molecular genetic characteristics of colorectal cancer depending on the status of microsatellite instability. *Meditsinskiy Sovet.* 2022;16(9):139–146. (In Russ.) <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2022-16-9-139-146>.

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Алгоритм принятия решения в лечении пациентов как с локализованным, так и с распространенным колоректальным раком (КРР) за последние годы сильно изменился, и теперь учитываются не только клинические, но и молекулярные особенности опухоли. Выявление молекулярно-генетических маркеров позволяет не только объективизировать и определять терапевтическую тактику, но и предсказывать течение заболевания [1, 2]. На сегодняшний день такими маркерами для пациентов с метастатическим КРР являются микросателлитная нестабильность (МСН), мутации в генах семейства *RAS* (*KRAS* и *NRAS*), *BRAF*, амплификация гена *HER2* и транслокации генов *NTRK1–3* [3, 4]. Однако до сих пор наиболее важной задачей является внедрение данных маркеров в повседневную клиническую практику.

Появление МСН обусловлено мутациями в генах системы исправления ошибок репликации, что приводит к неспособности исправлять ошибки, возникающие при репликации ДНК и, как следствие, к накоплению мутаций в повторяющихся последовательностях-микросателлитах [5–7]. КРР с МСН характеризуются высокой мутационной нагрузкой с образованием в результате мутаций сдвига рамки считывания высокоиммуногенных неоантигенов, которые вызывают активную инфильтрацию цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов [8]. МСН является основным прогностическим маркером эффективности ингибиторов контрольных точек иммунитета (ИКТ) [9]. В то время как МСН-отрицательный КРР в основном устойчив к ИКТ, опухоли с МСН обладают высокой чувствительностью к анти-PD-1 антителам в виде монотерапии либо в комбинации с анти-CTLA-4 антителами [10].

RAS и *BRAF* – основные гены, белки которых являются главными участниками внутриклеточного сигнального пути *EGFR* [11, 12]. При проведении анти-*EGFR* терапии у пациентов с распространенным КРР мутации в генах семейства *RAS*, а также мутация V600E в гене *BRAF* обуславливают конститутивную активацию нижележащих белков сигнального каскада *EGFR* и, как следствие, к появлению обходных путей при блокаде передачи сигналов

от *EGFR* [13]. Таким образом, для пациентов с наличием aberrаций в генах *RAS* и *BRAF* данная таргетная терапия оказывается неэффективна. Более того, пациенты с любыми активирующими мутациями *RAS* имеют менее благоприятный прогноз при добавлении анти-*EGFR* антител к химиотерапии по сравнению с аналогичными пациентами без таргетной терапии [14]. Наличие мутации V600E в гене *BRAF* является показанием для применения ингибитора *BRAF* в комбинации с анти-*EGFR* антителами с или без ингибитора MEK [15].

Амплификация гена *HER2* также является предиктором неэффективности применения анти-*EGFR* антител [16]. При проведении таргетной терапии была показана более низкая выживаемость без прогрессирования у пациентов с данной aberrацией по сравнению с пациентами, имеющими диккий тип гена *HER2* [17]. Однако новой опцией в лечении пациентов с метастатическим КРР с амплификацией является двойная анти-*HER2*-терапия [18, 19].

Транслокации генов *NTRK1–3* стала новой терапевтической мишенью при злокачественных опухолях. Ингибиторы TRK (ларотректиниб, энтректиниб) продемонстрировали высокую клиническую эффективность у пациентов с наличием транслокаций независимо от гистологического типа [20]. Транслокации *NTRK* при КРР встречаются достаточно редко (менее 1%) [20]. Следовательно, необходим более точный поиск кандидатов для выявления *NTRK*. Одним из путей решения является определение транслокаций в МСН-положительном КРР, где распространенность *NTRK* значительно выше и составляет 7% [21].

Целью исследования является определение характерных особенностей мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* и амплификации гена *HER2* в зависимости от статуса МСН при КРР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 400 пациентов с КРР. Все образцы, полученные от пациентов, были представлены блоками тканей, фиксированных формалином и залитых парафином. Из них 252 образца были представлены

раком ободочной кишки и ректосигмоидного отдела, а 148 – раком прямой кишки. Клинико-эпидемиологическая информация о пациентах, включенных в исследование, представлена в *табл. 1*. Все включенные в исследование пациенты подписали добровольное информированное согласие на сбор патоморфологического материала, клинико-лабораторных данных и проведение молекулярно-генетического тестирования.

Всем пациентам проводилось определение статуса MCH, наличия мутации V600E в гене *BRAF*, мутаций в 12, 13, 59, 61, 117, 146 кодонах гена *KRAS* и *NRAS*. У 100 пациентов, у которых не было выявлено мутаций в генах *BRAF*, *KRAS* и *NRAS*, проводилось определение амплификации гена *HER2*. В свою очередь, всем MCH-положительным пациентам с KPP осуществлялось исследование транслокаций генов *NTRK1–3* с помощью метода на основе ПЦП. 185 пациентам в сыворотке крови также был измерен предоперационный уровень онкомаркеров как предикторов раннего рецидива: раково-эмбрионального антигена (РЭА) и СА19-9. Для исключения ложной интерпретации полученных взаимосвязей между уровнем маркеров и молекулярно-генетическими особенностями были дополнительно собраны следующие показатели, которые оказывают влияние на значение онкомаркеров в крови: размер первичной опухоли, статус курения, наличие воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта, а также заболеваний почек и печени.

Выделение ДНК. Перед осуществлением данного этапа проводилась макродиссекция парафинового блока для увеличения содержания опухолевой ткани в изучаемом образце. Экстракция ДНК осуществлялась с использованием набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) согласно инструкции производителя.

Микросателлитная нестабильность. Молекулярно-генетическое исследование MCH проводилось с помощью фрагментного анализа с использованием панели из 5 микросателлитных маркеров: BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, NR-27. Подробное описание метода, условий реакции и особенностей интерпретации результатов описано в работе А.А. Мусаеляна и др., опубликованной в 2021 г. [22].

Определение мутации V600E в гене BRAF. Исследование данной мутации проводилось при помощи модифицированной аллель-специфической ПЦП с последующим анализом кривых плавления. Особенностью метода, использованного в работе, является искусственное внесение в предпоследней позиции некомплементарного основания [23]. Это способствует увеличению чувствительности и специфичности ПЦП амплификации. Для выполнения реакции был использован коммерческий мастер-микс iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Объем и условия реакции проводились согласно инструкции производителя.

Определение мутаций в генах KRAS и NRAS. Определение данных aberrаций осуществлялось в 2 этапа. Первый этап представлял собой исследование наиболее частых мутаций в гене *KRAS*: *G12V*, *G13D*, *G12D*, *G12C*, *G12S*, *G12A*, *G12R*. Исследование данных мутаций

● **Таблица 1.** Клинико-эпидемиологические характеристики пациентов, включенных в исследование

● **Table 1.** Clinico-epidemiological characteristics of patients included in the study

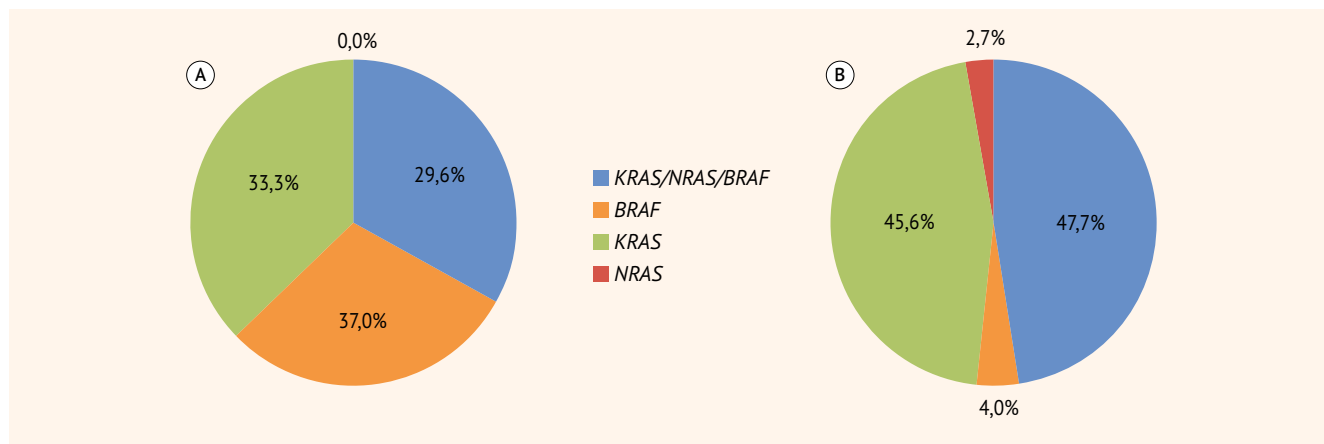
Характеристики	Исследуемая группа
Возраст, медиана (ИКР), n (%)	64 (57–70)
• <60	156 (39,7)
• >60	241 (60,3)
Пол	
• Мужской	248 (62)
• Женский	152 (38)
Локализация опухоли, n (%)	
• Рак ободочной кишки	232 (58)
• Рак ректосигмоидного отдела	20 (5)
• Рак прямой кишки	148 (37)
Стадия, n (%)	
• I	36 (9,0)
• II	103 (25,8)
• III	68 (17,0)
• IV	193 (48,2)

проводилось с применением аллель-специфической ПЦП с анализом кривых плавления. Особенности метода и используемый коммерческий реактив были аналогичны определению мутации V600E в гене *BRAF*. При отсутствии перечисленных мутаций в гене *KRAS* исследовалось наличие мутаций в 3 и 4 экзонах гена *KRAS* и во 2-м, 3-м, 4-м экзонах гена *NRAS*. Этот этап проводился с применением мультиплексной ПЦП в реальном времени с помощью коммерческой тест-системы RAS Mutation Screening Panel (Entrogen). Ввиду того, что данный набор не позволяет определять конкретную точечную мутацию в указанных экзонах, для верификации aberrации проводилась аллель-специфическая ПЦП с анализом кривых плавления. Последний метод был разработан для каждой точечной мутации, входящей в коммерческую скрининговую панель, аналогично таковым для ранее описанных распространенных aberrаций в данном гене.

Определение амплификации гена HER2. Определение данной альтерации осуществлялось с помощью метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием двух зондов: для *HER2* и для центромеры хромосомы 17. Выявление амплификации проводилось с использованием проб для FISH набора Leica, дальнейшая интерпретация результатов осуществлялась в соответствии с рекомендацией ASCO/CAP [24].

Определение транслокаций генов NTRK. Проводилось определение наиболее распространенных транскриптов слияния генов *NTRK1–3*: *TPM3-NTRK1*, *NACC2-NTRK2*, *QKI-NTRK2*, *ETV6-NTRK3*. Для определения данных транслокаций осуществлялась экстракция мРНК из парафиновых блоков с помощью коммерческого набора PureLink™ FFPE Total RNA Isolation Kit (Invitrogen). Далее проводилась двухэтапная ПЦП с обратной транскрипцией. Первый этап представлял собой синтез комплементарной ДНК (кДНК) с помощью набора реагентов “РЕБЕРТА-Л” (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). На втором этапе определялось наличие перечисленных ранее транскриптов слияния генов семейства *NTRK* с помощью

● **Рисунок 1.** Распространенность мутаций в генах *BRAF*, *KRAS* и *NRAS* при МСН-положительном (А) и МСН-отрицательном колоректальном раке (В)
 ● **Figure 1.** The prevalence of mutations in genes *BRAF*, *KRAS* and *NRAS* in MSI-positive (A) and MSI-negative colorectal cancer (B)



TaqMan® проб и TaqMan® Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Статистический анализ. Статистический анализ полученных данных был проведен с использованием программы GraphPad Prism 8.2 (GraphPad Software Inc.). Для сравнительного анализа качественных признаков был использован точный тест Фишера. Для анализа сравниваемых групп, которые в данном исследовании не соответствовали нормальности распределения согласно критерию Шапиро-Уилка, был применен U-теста Манн-Уитни. При исследовании предоперационного уровня онкомаркеров была использована многофакторная логистическая регрессия для определения зависимости дихотомических переменных от независимых переменных. Результаты определялись как статистически значимые при $p < 0,05$.

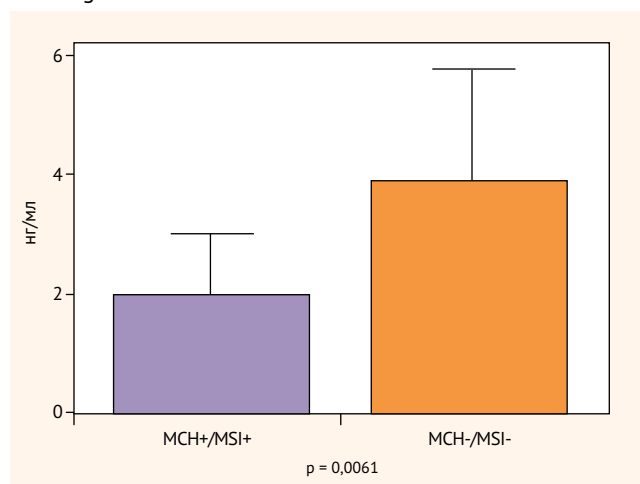
РЕЗУЛЬТАТЫ

Микросателлитная нестабильность. Распространенность МСН-положительного КРР оказалась равна 6,8% (27/400). Общая распространенность aberrаций в генах *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* составила 53,3% (213/400) и в зависимости от статуса МСН была следующей: при МСН-положительном КРР – 66,7% (18/27), а при МСН-отрицательном КРР – 52,3% (195/373) (рис. 1).

Клинико-морфологические особенности опухолей с МСН описаны в работе А.А. Трякина и др., опубликованной в 2019 г. [10]. Показано, что у пациентов с МСН-положительным КРР уровень РЭА оказался достоверно значимо ниже, чем у пациентов с КРР с отсутствием МСН: медиана уровня маркера оказалась равна 2,0 нг/мл (интерквартильный размах (ИКР): 0,7–3,4; $n = 20$) против 3,9 нг/мл (ИКР: 1,1–13,1; $n = 165$) соответственно ($p = 0,0061$) (рис. 2). При этом по результатам многофакторной логистической регрессии, включавшей наличие сопутствующих заболеваний, влияющих на уровень РЭА, статус курения и размер первичного образования, сохранялась ассоциация между наличием МСН и более низким предоперационным РЭА ($p = 0,028$).

● **Рисунок 2.** Уровень РЭА у пациентов с МСН-положительным и МСН-отрицательным колоректальным раком

● **Figure 2.** CEA level in patients with MSI-positive and MSI-negative colorectal cancer



Мутации в гене *KRAS*. Общая распространенность мутаций во 2-м, 3-м, 4-м экзонах гена *KRAS* составила 45% (180/400). В зависимости от статуса МСН распространенность данных aberrаций была следующей: в МСН-положительных случаях – 37% (10/27), а при МСН-отрицательном КРР – 45,6% (170/373) (табл. 2). Относительное распределение мутаций в гене *KRAS* было следующее: наиболее часто aberrации затрагивали экзон 2 (91,9%), менее часто – экзоны 3 и 4, которые составили 5,2% и 2,9% *KRAS*-положительных случаев соответственно. В МСН-положительном КРР мутации были представлены исключительно во 2-м экзоне: кодон 12 составил 60% случаев (в равной степени G12D и G12V), а кодон 13 – 40% (G13D).

Независимо от статуса МСН *KRAS*-положительные случаи чаще представляли собой более высоко и умеренно дифференцированные опухоли ($p = 0,0047$): при G1-2 распространенность была равна 48,9% (134/274), а при G3 – 33,3% (42/126). В зависимости от статуса *KRAS* не было выявлено взаимосвязи со следующими показателями

($p > 0,05$): полом, возрастом, локализацией опухоли, категорией Т и N, гистологическим типом, локализацией метастазов, наличием муцинозного компонента, опухолеинфильтрирующих лимфоцитов, лимфоваскулярной и периневральной инвазией, а также РЭА и СА19-9.

Мутации в гене NRAS. Распространенность мутаций во 2-м, 3-м, 4-м экзонах гена *NRAS* составила 2,5% (10/400). При этом в МСН-положительных случаях аббераций в гене *NRAS* не было обнаружено. Не продемонстрировано также взаимосвязи между наличием аббераций в гене *NRAS* и следующими клиничко-морфологическими параметрами ($p > 0,05$): полом, возрастом, локализацией первичной опухоли, наличием муцинозного компонента, опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, лимфоваскулярной и периневральной инвазией, категорией Т и N, наличием отдаленных метастазов, степенью дифференцировки, уровнем РЭА и СА19-9.

Мутация V600E в гене BRAF. Общая распространенность мутации *BRAF* V600E оказалась равна 5,8% (23/400). У пациентов с МСН-положительными опухолями мутация V600E в гене *BRAF* встречается статистически значимо чаще, чем у пациентов с МСН-отрицательным КРР ($p < 0,0001$): 29,6% (8/27) против 4,0% (15/373) соответственно (табл. 2). *BRAF*-положительные опухоли, независимо от статуса МСН, чаще имеют правостороннюю локализацию, чем левостороннюю: 14,6% (14/96) и 3,0% (9/304) соответственно ($p < 0,0001$) (табл. 3). Также для КРР, имеющего мутацию V600E в гене *BRAF*, характерна более распространенная первичная опухоль ($p = 0,013$): для категории Т3–4 распространенность абберации составила 7,4% (22/296), а для Т1–2 – 1,0% (1/104). Другой характерной особенностью *BRAF*-положительных опухолей является наличие вовлеченных регионарных лимфатических узлов (pN+) ($p = 0,004$). Распространенность мутации *BRAF* V600E при pN+ оказалась равна 10,1% (16/159), а при pN0 – 2,9% (7/241). Опухоли с распространенным процессом, несущие мутацию V600E в гене *BRAF*, чаще имеют метастазы по брюшине, чем другие локализации отдаленных поражений: распространенность равна 16,7% (4/24) против 4,7% (8/169) соответственно ($p = 0,046$).

У пациентов с *BRAF*-положительным КРР уровень СА19-9 был достоверно выше, чем у пациентов с опухолью, име-

● **Таблица 2.** Распространенность мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* в зависимости от статуса МСН

● **Table 2.** The prevalence of mutations in the *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* genes depending on the status of MSI

Исследуемый ген	МСН+, n (%) (n = 27)	МСН-, n (%) (n = 373)	p
Мутации в гене <i>KRAS</i>			0,376
• Да	10 (37,0)	170 (45,6)	
• Нет	17 (63,0)	201 (54,4)	
Мутации в гене <i>NRAS</i>			1,0
• Да	0 (0)	10 (2,7)	
• Нет	27 (100)	362 (97,6)	
Мутация V600E в гене <i>BRAF</i>			<0,0001
• Да	8 (29,6)	15 (4,0)	
• Нет	19 (70,4)	358 (96,0)	

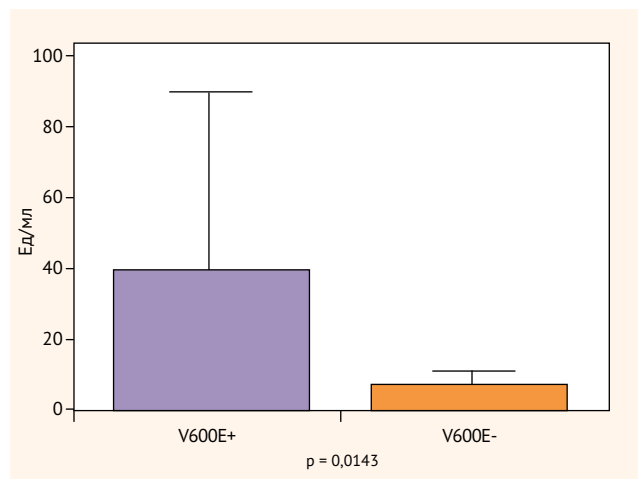
● **Таблица 3.** Клиничко-морфологические особенности *BRAF*-положительных опухолей

● **Table 3.** Clinical and morphological features of *BRAF*-positive tumors

Характеристики	<i>BRAF</i> V600E+, n (%)	<i>BRAF</i> V600E-, n (%)	p
Локализация опухоли			<0,0001
• Правосторонняя	14 (60,9)	82 (21,8)	
• Левосторонняя	9 (39,1)	295 (78,2)	
Категория Т			0,013
• pT1–2	1 (4,3)	103 (27,3)	
• pT3–4	22 (95,7)	274 (72,7)	
Категория N			0,004
• pN0	7 (30,4)	234 (62,1)	
• pN+	16 (69,6)	143 (37,9)	
Метастазы по брюшине			0,046
• Да	4 (33,3)	20 (11,1)	
• Нет	8 (66,7)	161 (88,9)	

● **Рисунок 3.** Уровень СА19-9 у пациентов с колоректальным раком в зависимости от наличия мутации V600E в гене *BRAF*

● **Figure 3.** CA19-9 level in patients with colorectal cancer depending on the presence of the V600E mutation in the *BRAF* gene



ющей дикий тип гена *BRAF*: медиана маркера была равна 41,0 Ед/мл (ИКР: 14,7–89,0; $n = 15$) и 7,8 Ед/мл (ИКР: 2,2–37,3; $n = 170$) соответственно ($p = 0,014$) (рис. 3). При этом по результатам многофакторной логистической регрессии, включавшей наличие сопутствующих заболеваний, влияющих на уровень СА19-9 и размер первичной опухоли, сохранялась взаимосвязь между наличием *BRAF* V600E и более высоким предоперационным СА19-9 ($p = 0,042$).

В зависимости от наличия мутации V600E в гене *BRAF* не было показано достоверной взаимосвязи с полом, возрастом, степенью дифференцировки, наличием отдаленных метастазов, наличием муцинозного компонента, опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, лимфоваскулярной и периневральной инвазией и уровнем РЭА ($p > 0,05$).

Амплификация гена HER2. Распространенность данной альтерации при *RAS/BRAF* отрицательных случаях КРР составила 7% (7/100). У пациентов с МСН-положительным КРР мутантный тип гена *HER2* не был

обнаружен. Распространенность амплификации гена *HER2* при раке прямой кишки оказалась выше, чем при других локализациях опухоли ($p = 0,044$): 13,3% (6/45) против 1,8% (1/55) соответственно (табл. 4). *HER2*-положительный КРР характеризовался большей глубиной инвазии первичной опухоли, чем *HER2*-отрицательные случаи: при Т3–4 – 11,5% (7/61) и при Т1–2 – 0% (0/39) соответственно ($p = 0,041$). Также КРР, имеющий амплификацию гена *HER2*, чаще представлял собой метастатический процесс, чем локализованный и местнораспространенный: 15,2% (5/33) против 3,0% (2/67) соответственно ($p = 0,038$).

Не показано статической связи между наличием амплификации гена *HER2* и с такими характеристиками, как пол, возраст, поражение регионарных лимфатических узлов, наличие муцинозного компонента, опухолинфильтрирующих лимфоцитов, лимфоваскулярной и периневральной инвазией, степенью дифференцировки, уровнем РЭА и СА19-9 ($p > 0,05$).

Транслокации *NTRK*. При анализе всех МСН-положительных случаев не обнаружено (0/27) распространенных транскриптов *TPM3-NTRK1*, *NACC2-NTRK2*, *QKI-NTRK2*, *ETV6-NTRK3*.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования показано, что распространенность МСН при КРР составила 6,8%, схожие результаты были продемонстрированы в работе Д.В. Пашкова и др. [5]. Показано, что опухоли с МСН достоверно чаще имеют мутацию V600E в гене *BRAF*. Также в МСН-положительных случаях общая распространенность мутаций в основных генах *RAS* и *BRAF* оказалась выше, чем в опухолях с отсутствием МСН. Согласно Атласу ракового генома в МСН-положительном КРР отмечается более высокий уровень общего количества мутаций [25], однако в МСН-положительных случаях не было обнаружено транслокаций *NTRK*. Отсутствие этой альтерации обусловлено небольшой выборкой МСН-положительных пациентов, имеющих дикий тип генов *RAS* и *BRAF*, а также тем, что в исследовании проводилось определение наиболее распространенных вариантов слияния генов *NTRK1–3* [13].

По результатам исследования необходимо отметить, что пациенты с МСН-положительным КРР имеют более низкий предоперационный уровень РЭА по сравнению с пациентами, не имеющими МСН, что находит отражение и в работе P. Kasi et al. [26]. Более низкий предоперационный уровень этого маркера объясняется взаимосвязью с низким риском рецидива заболевания [19].

Распространенность мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* составила 45% и 2,5% соответственно, что согласуется с результатами ряда отечественных работ [27]. Единственной выявленной взаимосвязью было наличие степени дифференцировки G1–2 в *KRAS*-положительных опухолях. Противоречивые данные об ассоциации между наличием агрессивных клиничко-морфологических характеристик опухоли и статусом генов семейства *RAS* продемонстрированы в ряде зарубежных исследований [11].

● **Таблица 4.** Клиничко-морфологический паттерн *HER2*-положительного КРР


● **Table 4.** Clinical and morphological pattern of *HER2*-positive CRC

Характеристики	HER2+, n (%) (n = 7)	HER2-, n (%) (n = 93)	p
Локализация			0,044
• Рак прямой кишки	6 (85,7)	39 (41,9)	
• Другие локализации	1 (14,3)	54 (58,1)	
Категория Т			0,041
• pT1–2	0 (0,0)	39 (41,9)	
• pT3–4	7 (100)	54 (58,1)	
Отдаленные метастазы			0,038
• Да	5 (71,4)	28 (30,1)	
• Нет	2 (28,6)	65 (69,9)	

Мутация V600E в гене *BRAF* была обнаружена в 5,8% случаев КРР. Схожие данные о распространенности аберрации в российской популяции показаны в работе М.Ю. Федянина и др. [28]. Мутация *BRAF* V600E достоверно чаще обнаруживалась при правосторонней локализации опухоли. Также *BRAF*-положительные опухоли характеризовались наличием негативного клиничко-морфологического паттерна: более высокой категорией Т (Т3–4), поражением регионарных лимфатических узлов, а также наличием метастазов по брюшине. У пациентов с *BRAF*-положительными опухолями был обнаружен высокий предоперационный уровень СА19-9. В ряде исследований показано, что высокое значение маркера ассоциировано с неблагоприятным прогнозом [26].

Впервые показана распространенность амплификации гена *HER2* в российской популяции. В *RAS/BRAF*-отрицательном КРР мутантный тип гена *HER2* обнаружен в 7% случаев. Согласно ряду зарубежных исследований распространенность амплификации гена *HER2* у пациентов с диким типом генов *RAS* и *BRAF* составляет 5–14% [4]. Нами не была обнаружена амплификация *HER2* в случаях КРР с наличием МСН. Аналогичные результаты сообщались в зарубежных литературных источниках [29]. Мутантный тип гена *HER2* преимущественно обнаруживается у пациентов с раком прямой кишки. *HER2*-положительные случаи характеризуются распространенностью первичной опухоли и наличием отдаленных метастазов. Однако имеются противоречивые данные о прогностической роли амплификации гена *HER2* при КРР [30].

ВЫВОДЫ

МСН-положительный КРР имеет более высокую распространенность основных мутаций и связан с низким уровнем РЭА, который ассоциирован с низким риском рецидива. Также показана взаимосвязь между мутантными типами генов *BRAF*, *HER2* и наличием агрессивных клиничко-морфологических особенностей. 

Поступила / Received 20.11.2021

Поступила после рецензирования / Revised 18.01.2022

Принята в печать / Accepted 06.04.2022

- Kim S.Y., Kim T.W. Current challenges in the implementation of precision oncology for the management of metastatic colorectal cancer. *ESMO Open*. 2020;5(2):e000634. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2019-000634>.
- Singh M.P., Rai S., Pandey A., Singh N.K., Srivastava S. Molecular subtypes of colorectal cancer: An emerging therapeutic opportunity for personalized medicine. *Genes Dis*. 2019;8(2):133–154. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.10.013>.
- Poulsen T.S., de Oliveira D.V.N.P., Espersen M.L.M., Klarskov L.L., Skovridner-Ruminski W., Hogdall E. Frequency and coexistence of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations and occurrence of MMR deficiency in Danish colorectal cancer patients. *APMIS*. 2021;129(2):61–69. <https://doi.org/10.1111/apm.13091>.
- Benson A.B., Venook A.P., Al-Hawary M.M., Arain M.A., Chen Y.-J., Ciombor K.K. et al. Colon Cancer, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Cancer Netw*. 2021;19(3):329–259. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2021.0012>.
- Пашков Д.В., Венина А.Р., Иванцов А.О., Янус Г.А., Раскин Г.А., Имянитов Е.Н. и др. Рак толстой кишки с микросателлитной нестабильностью у пожилых больных: роль иммунодефицита и клинические особенности. *Сибирский онкологический журнал*. 2020;19(1):31–39. <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2020-19-1-31-39>.
Pashkov D.V., Venina A.R., Ivantsov A.O., Yanus G.A., Raskin G.A., Imyanitov E.N. et al. Microsatellite-unstable colorectal cancer in elderly patients: Clinical features and the role of immunodeficiency. *Siberian Journal of Oncology*. 2020;19(1):31–39. (In Russ.) <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2020-19-1-31-39>.
- Yamamoto H., Watanabe Y., Maehata T., Imai K., Itoh F. Microsatellite instability in cancer: a novel landscape for diagnostic and therapeutic approach. *Arch Toxicol*. 2020;94(10):3349–3357. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02835-z>.
- Cao Y., Zhang G., Zhang J., Yang Y., Ren J., Yan X. et al. Predicting Microsatellite Instability Status in Colorectal Cancer Based on Triphasic Enhanced Computed Tomography Radiomics Signatures: A Multicenter Study. *Front Oncol*. 2021;11:687771. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.687771>.
- Lichtenstern C.R., Ngu R.K., Shalpour S., Karin M. Immunotherapy, Inflammation and Colorectal Cancer. *Cells*. 2020;9(3):618. <https://doi.org/10.3390/cells9030618>.
- Marcus L., Lemery S.J., Keegan P., Pazdur R. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2019;25(13):3753–3758. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-4070>.
- Трякин А.А., Федянин М.Ю., Цуканов А.С., Шельгин Ю.А., Покатаев И.А., Игнатова Е.О. и др. Микросателлитная нестабильность как уникальная характеристика опухолей и предиктор эффективности иммунотерапии. *Злокачественные опухоли*. 2019;9(4):59–69. <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2019-9-4-59-69>.
- Трякин А.А., Федянин М.Ю., Цуканов А.С., Шельгин Ю.А., Покатаев И.А., Игнатова Е.О. et al. Microsatellite instability as a unique characteristic of tumors and a predictor of response to immune therapy. *Malignant Tumours*. 2019;9(4):59–69. (In Russ.) <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2019-9-4-59-69>.
- Serebriiskii I.G., Connelly C., Frampton G., Newberg J., Cooke M., Miller V. et al. Comprehensive characterization of RAS mutations in colon and rectal cancers in old and young patients. *Nat Commun*. 2019;10(1):3722. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11530-0>.
- Bond C.E., Whitehall V.L.J. How the BRAF V600E Mutation Defines a Distinct Subgroup of Colorectal Cancer: Molecular and Clinical Implications. *Gastroenterol Res Pract*. 2018;2018:9250757. <https://doi.org/10.1155/2018/9250757>.
- Cohen R., Pudlacz T., Delattre J.-F., Colle R., André T. Molecular Targets for the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9):2350. <https://doi.org/10.3390/cancers12092350>.
- Douillard J.-Y., Oliner K.S., Siena S., Tabernero J., Burkes R., Barugel M. et al. Panitumumab-FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2013;369(11):1023–1034. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1305275>.
- Grassi E., Corbelli J., Papiani G., Barbera M.A., Gazzaneo F., Tambari S. Current Therapeutic Strategies in BRAF-Mutant Metastatic Colorectal Cancer. *Front Oncol*. 2021;11:601722. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.601722>.
- Oh D.-Y., Bang Y.-J. HER2-targeted therapies – a role beyond breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17(1):33–48. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0268-3>.
- Siena S., Sartore-Bianchi A., Marsoni S., Hurwitz H.I., McCall S.J., Penault-Llorca F. et al. Targeting the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) oncogene in colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2018;29(5):1108–1119. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy100>.
- Lee M.K.C., Loree J.M. Current and emerging biomarkers in metastatic colorectal cancer. *Curr Oncol*. 2019;26(Suppl 1):S7–S15. <https://doi.org/10.3747/co.26.5719>.
- Федянин М.Ю., Ачкасов С.И., Болотина Л.В., Гладков О.А., Глебовская В.В., Гордеев С.С. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака ободочной кишки и ректосигмоидного соединения. *Злокачественные опухоли*. 2020;10(3s2–1):350–391. <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-22>.
Fedyanin M.Yu., Achkasov S.I., Bolotina L.V., Gladkov O.A., Glebovskaya V.V., Gordeev S.S. et al. Practical guidelines for the drug treatment of colon and rectosigmoid junction cancer. *Malignant Tumors*. 2020;10(3s2–1):350–391. (In Russ.) <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-22>.
- Solomon J.P., Linkov I., Rosado A., Mullaney K., Rosen E.Y., Frosina D. et al. NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. *Mod Pathol*. 2020;33(1):38–46. <https://doi.org/10.1038/s41379-019-0324-7>.
- Yamashiro Y., Kurihara T., Suehara Y., Yao T., Kato S., Saito T. NTRK fusion in Japanese colorectal adenocarcinomas. *Sci Rep*. 2021;11(1):5635. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85075-y>.
- Мусаелян А.А., Назаров В.Д., Будникова А.С., Лапин С.В., Воробьев С.Л., Эмануэль В.Л. и др. Клинико-морфологический портрет опухолей с микросателлитной нестабильностью. *Успехи молекулярной онкологии*. 2021;8(2):52–59. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2021-8-2-00-00>.
Musaelyan A.A., Nazarov V.D., Budnikova A.S., Lapin S.V., Vorobyev S.L., Emanuel V.L. et al. Clinical and morphological portrait of tumors with microsatellite instability. *Uspehi Molekularnoj Onkologii*. 2021;8(2):52–59. (In Russ.) <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2021-8-2-00-00>.
- Lang A.H., Drexel H., Geller-Rhomberg S., Stark N., Winder T., Geiger K. et al. Optimized allele-specific real-time PCR assays for the detection of common mutations in KRAS and BRAF. *J Mol Diagn*. 2011;13(1):23–28. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2010.11.007>.
- Wolff A.C., Hammond M.E.H., Allison K.H., Harvey B.E., Mangu P.B., Bartlett J.M.S. et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*. 2018;36(20):2105–2122. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.77.8738>.
- Shia J., Schultz N., Kuk D., Vakiani E., Middha S., Segal N.H. et al. Morphological characterization of colorectal cancers in The Cancer Genome Atlas reveals distinct morphology-molecular associations: clinical and biological implications. *Mod Pathol*. 2017;30(4):599–609. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.198>.
- Kasi P.M., Kamatham S., Shahjehan F., Li Z., Johnson P.W., Merchea A. et al. BRAF-V600E and microsatellite instability prediction through CA-19-9/CEA ratio in patients with colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol*. 2020;11(2):236–241. <https://doi.org/10.21037/jgo.2019.12.08>.
- Yanus G.A., Belyaeva A.V., Ivantsov A.O., Kuligina E.S., Susptitsin E.N., Mitiushkina N.V. et al. Pattern of clinically relevant mutations in consecutive series of Russian colorectal cancer patients. *Med Oncol*. 2013;30(3):686. <https://doi.org/10.1007/s12032-013-0686-5>.
- Федянин М.Ю., Эльснукеева Х.М., Демидова И.А., Строяковский Д.Л., Шельгин Ю.А., Цуканов А.С. и др. Колоректальный рак с мутацией в гене BRAF в Российской Федерации: эпидемиология и клинические особенности. Результаты многоцентрового исследования. *Медицинский совет*. 2021;(45):52–63. Режим доступа: <https://www.med-sovet.pro/jour/article/view/6211>.
Fedyanin M.Yu., Ehlshnukaeva K.M., Demidova I.A., Stroyakovskiy D.L., Shelygin Yu.A., Tsukanov A.S. et al. Incidence and prognostic factors in patients (pts) with mutant BRAF (mBRAF) metastatic colorectal cancer (mCRC) in Russia. *Meditsinskiy Sovet*. 2021;(45):52–63. (In Russ.) Available at: <https://www.med-sovet.pro/jour/article/view/6211>.
- Qiu M.-Z., He C.-Y., Yang X.-H., Yang L.-Q., Lin J.-Z., Zhou D.-L. et al. Relationship of HER2 alteration and MSI status in colorectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2021;26(7): e1161–e1170. https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.3_suppl.121.
- Wang X.-Y., Zheng Z.-X., Sun Y., Bai Y.-H., Shi Y.-F., Zhou L.-X. et al. Significance of HER2 protein expression and HER2 gene amplification in colorectal adenocarcinomas. *World J Gastrointest Oncol*. 2019;11(4):335–347. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v11.i4.335>.

Информация об авторах:

Оганян Карина Амбарцумовна, студентка лечебного факультета, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова; 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8; <https://orcid.org/0000-0002-2743-0882>; oganyankarina00@gmail.com

Мусаелян Арам Ашотович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова; 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8; сотрудник лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний, Научно-исследовательский институт медицинской приматологии; 354376, Краснодарский край, с. Веселое, ул. Мира, д. 177; <https://orcid.org/0000-0002-7570-2256>; a.musaelyan8@gmail.com

Котикова Маретта Алихановна, клинический ординатор кафедры онкологии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова; 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8; <https://orcid.org/0000-0001-7966-6478>; maretta.kotikova@mail.ru

Лалин Сергей Владимирович, к.м.н., заведующий лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ молекулярной медицины, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова; 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8; <https://orcid.org/0000-0002-4998-3699>; svlapin@mail.ru

Назаров Владимир Дмитриевич, к.м.н., младший научный сотрудник лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ молекулярной медицины, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова; 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8; <https://orcid.org/0000-0002-9354-8790>; nazarov19932@mail.ru

Беляев Михаил Алексеевич, к.м.н., руководитель отделения абдоминальной онкологии НИИ хирургии и неотложной медицины, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова; 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8; <https://orcid.org/0000-0003-0830-3797>; 8628926@mail.ru

Захаренко Александр Анатольевич, д.м.н., профессор, руководитель отдела онкохирургии НИИ хирургии и неотложной медицины, заместитель главного врача по онкологии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова; 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8; <https://orcid.org/0000-0002-8514-5377>; 9516183@mail.ru

Орлов Сергей Владимирович, чл.- корр. РАН, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник отдела клинической онкологии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова; 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8; директор, Научно-исследовательский институт медицинской приматологии; 354376, Краснодарский край, с. Веселое, ул. Мира, д. 177; <https://orcid.org/0000-0001-6080-8042>; orloff-sv@mail.ru

Information about the authors:

Karina A. Oganyan, Student of the Medical Faculty, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University; 6–8, Lev Tolstoy St., St Petersburg, 197022, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-2743-0882>; oganyankarina00@gmail.com

Aram A. Musaelyan, Junior Researcher, Center for Molecular Medicine, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University; 6–8, Lev Tolstoy St., St Petersburg, 197022, Russia; Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, Research Institute of Medical Primatology; 177, Mira St., Veseloe Village, Krasnodar Region, 354376, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-7570-2256>; a.musaelyan8@gmail.com

Maretta A. Kotikova, Resident at the Department of Oncology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University; 6–8, Lev Tolstoy St., St Petersburg, 197022, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-7966-6478>; maretta.kotikova@mail.ru

Sergey V. Lapin, Cand. Sci. (Med.), Chief, Laboratory of Autoimmune Diagnostics, Center for Molecular Medicine, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University; 6–8, Lev Tolstoy St., St Petersburg, 197022, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-4998-3699>; svlapin@mail.ru

Vladimir D. Nazarov, Cand. Sci. (Med.), Junior Researcher, Laboratory of Autoimmune Diagnostics, Center for Molecular Medicine, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University; 6–8, Lev Tolstoy St., St Petersburg, 197022, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-9354-8790>; nazarov19932@mail.ru

Mikhail A. Belyaev, Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of Abdominal Oncology at the Research Institute of Surgery and Emergency Medicine, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University; 6–8, Lev Tolstoy St., St Petersburg, 197022, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-0830-3797>; 8628926@mail.ru

Aleksandr A. Zakharenko, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Oncosurgery, Research Institute of Surgery and Emergency Medicine, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University; 6–8, Lev Tolstoy St., St Petersburg, 197022, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-8514-5377>; 9516183@mail.ru

Sergey V. Orlov, Corr. Member RAS, Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading Researcher of the Clinical Oncology Department, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University; 6–8, Lev Tolstoy St., St Petersburg, 197022, Russia; Director, Research Institute of Medical Primatology; 177, Mira St., Veseloe Village, Krasnodar Region, 354376, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-6080-8042>; orloff-sv@mail.ru