

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы Афонина Георгия Алексеевича на тему **«Молекулярно-генетический анализ развития колоректального рака у больных в возрасте до 50 лет»**, представленной на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности «6D110100-Медицина»

Актуальность темы исследования

По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) и Международного Агентства по изучению рака (IARC) в мире отмечается рост заболеваемости колоректальным раком (КРР) и к 2030 г. ожидается увеличение количества новых случаев до 2.2 миллионов в год (на 77% относительно 2018 г.) и смертности от данной патологии до 1.1 миллиона случаев (на 80% относительно 2018 г.) (Colorectum. Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018; Arnold M., 2016; Bray F., 2018).

В Республике Казахстан (РК) также отмечается ежегодный рост заболеваемости КРР, который находится на 3 месте по частоте встречаемости в общей структуре онкологической патологии. Согласно данным Национального канцер-регистра, в республике отмечаются стабильно высокие показатели смертности от КРР у мужчин и женщин, несмотря на функционирование с 2009 г. национальной программы скрининга КРР (Показатели онкологической службы Республики Казахстан за 2018 год). Также в РК наблюдается тенденция ежегодного роста числа случаев КРР у лиц в возрасте до 50 лет; за период 2008-2017 гг. зарегистрирован 3121 больной КРР в возрасте до 50 лет (включительно). Несмотря на то, что скорость роста абсолютного числа заболеваний у лиц в возрасте до 50 лет различна, прослеживается закономерность увеличения случаев КРР, в среднем на 2.3% ежегодно (Показатели онкологической службы Республики Казахстан за 2008-2017 годы). У данного контингента заболевание манифестирует до наступления порогового возраста скрининга (50 лет), и к моменту установления диагноза, отмечается, как правило, распространенный опухолевый процесс (O'Connell J.V., 2004).

В результате когортных исследований доказано, что для больных молодого возраста характерны локализация опухолевого процесса в дистальных отделах толстой кишки, «поздние» стадии заболевания, доля которых составляет, по данным некоторых авторов, более 70%, а также агрессивный характер течения и низкая степень дифференцировки опухолей (Gupta S., 2010; Negri F.V., 2005). В свою очередь такие фенотипические характеристики «агрессивности» как относительно быстрый опухолевый рост и метастазирование, низкая степень дифференцировки и характер ответа на терапию ингибиторами рецептора эпидермального фактора роста, обусловлены конкретными генотипическими различиями (Семьянихина А.В., 2020; Владимирова Л.Ю., 2016).

Многоцентровые исследования в США, странах Европы, Южной Кореи, Японии, Китае на репрезентативных когортах соответствующих этнических субпопуляций продемонстрировали ассоциативность индивидуальных генотипов с

риском развития КРР в молодом возрасте с учетом мультифакториальной природы заболевания (Johansen Taber K.A., 2014; Abecasis G.R., 2010; Lin P.H., 2016). Молекулярно-генетические исследования выявили такие фундаментальные свойства опухолей у молодых пациентов, как низкий уровень экспрессии белка p53, более высокий уровень ошибок репликации ДНК, выражающийся как микросателлитная нестабильность (МСН), специфические мутации гена *KRAS* и более высокий индекс ploидности по сравнению с опухолями пациентов из общей популяции (Negri F.V., 2005; Беляева А. В., 2012).

Анализ генов пациентов молодого возраста на основе секвенирования нового поколения (NGS) позволяет идентифицировать случаи КРР синдромальной (~5%) и спорадической (~95%) природы (Семьянихина А.В., с. 3). Это дает возможность стратифицировать уровень риска для конкретного пациента и его кровных родственников, модифицировать диагностические и терапевтические подходы и диспансеризацию. Учитывая доказательства функциональной значимости генов и «перекрывания фенотипов» наследственных синдромов, ассоциированных с КРР, а также случаи, когда причиной рака могут быть мутации более чем в одном гене, мультигенное тестирование (МГТ) представляет собой экономически эффективный метод молекулярно-генетического анализа, поскольку позволяет одновременно анализировать множество генов, в том числе связанных с прогнозом и ответом на терапию (Stanislaw C., 2016; Gallego S.J., 2015).

К настоящему времени результаты изучения данного направления в РК представлены в единичных публикациях.

Таким образом, увеличение заболеваемости КРР у лиц в возрасте до 50 лет, отсутствие ранней диагностики при семейных и наследственных формах данного вида рака, высокие показатели запущенности и низкие показатели выживаемости (по данным пилотных исследований III и IV стадии совокупно и 5-летняя выживаемость составляют 59.4% и 39.5% соответственно), обуславливают необходимость изучения молекулярно-генетической основы заболевания.

Цель исследования - оптимизация ранней диагностики и профилактики колоректального рака у лиц до 50 лет и с генетически отягощенным анамнезом.

Задачи исследования:

1. Изучить эпидемиологические аспекты КРР у лиц в возрасте до 50 лет в Республике Казахстан.
2. Провести сравнительный анализ клинико-фенотипических особенностей КРР в группах пациентов в возрасте до 50 лет и старше 65 лет.
3. Сформировать регистр пациентов в возрасте до 50 лет с созданием банка ДНК.
4. Провести молекулярно-генетическое исследование ДНК пациентов в возрасте до 50 лет на основе секвенирования нового поколения.
5. Разработать алгоритмы ранней диагностики и профилактики колоректального рака у лиц в возрасте до 50 лет и с генетически отягощенным анамнезом на основе молекулярно-генетического анализа.

Объектом исследования являются больные КРР в возрасте до 50 лет с верифицированным диагнозом, с различными стадиями заболевания.

Предметом исследования являются наследственные, семейные и спорадические варианты КРР у пациентов в возрасте до 50 лет.

Методы исследования: клинические, клинико-генеалогический (составление схем наследования заболевания), эндоскопический (колоноскопия), морфологический (гистологическое исследование), молекулярно-генетический (секвенирование нового поколения), биоинформационный анализ, статистический анализ.

Научная новизна:

Впервые проведена комплексная эпидемиологическая оценка заболеваемости КРР у лиц в возрасте до 50 лет за период 10 лет в масштабе республики и в разрезе регионов, с учетом половых и возрастных особенностей.

Впервые в Республике Казахстан изучены клинико-фенотипические особенности КРР у лиц в возрасте до 50 и старше 65 лет с учетом пола, стадии заболевания, гистологического строения и локализации опухоли.

Впервые в Республике Казахстан на основе секвенирования нового поколения проведен молекулярно-генетический анализ патогенных мутаций и вариантов с неопределенным функциональным значением, ассоциированных с КРР у пациентов в возрасте до 50 лет.

Впервые идентифицированы 17 новых, ранее не описанных мутаций, ассоциированных с развитием КРР.

Впервые в Республике Казахстан разработаны алгоритмы ранней диагностики и профилактики колоректального рака у лиц в возрасте до 50 лет и с генетически отягощенным анамнезом на основе молекулярно-генетического анализа.

Основные положения, выносимые на защиту

Эпидемиологический анализ выявил ежегодный рост числа случаев заболевания колоректальным раком в среднем на 2.3% среди лиц в возрасте до 50 лет с тенденцией увеличения доли распространенного опухолевого процесса (III, IV стадий).

Частота патогенных мутаций в генах с высокой пенетрантностью (*APC*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *BRCA1*, *BRCA2*) достоверно выше у пациентов с наследственно отягощенным анамнезом (21.1% против 3.1%; $p=0.0002$) и первично-множественными опухолями (20.0% против 3.1%; $p=0.0004$) по сравнению с пациентами с спорадическими вариантами заболевания (3.1%).

Патогенные мутации, вызывающие развитие колоректального рака, выявлены в участках генов (кодирующих функционально значимые районы соответствующих протеинов, промоторных и регуляторных последовательностях), характеризующихся высоким уровнем консервативности. Мутации в наиболее консервативных областях выявлены в генах, обеспечивающих стабильность генома с помощью механизмов супрессии опухолевого роста (*APC*), контроля уровня мутаций, репарации ДНК и поддержания генетической стабильности (*BRCA2*), контроля клеточного цикла (*CHEK2*), регуляции экспрессии генов (*DICER1*), поддержания хромосомной стабильности (*FANCI*), мисматч-репарации ДНК (*MSH2*, *PMS2*) и регуляции апоптоза и реакции на окислительный стресс (*MUTYH*).

Идентифицированы ранее не описанные в литературе 9 новых патогенных мутаций в генах *FANCI*, *APC*, *BMPRIA*, *ATM*, *DICER1*, *NBN* и 8 новых вариантов с делетирующим эффектом по данным *in silico* анализа в генах *ATM*, *NSD1*, *RBI*, *FANCD2*, *BLM*, *MSH2*, *DICER1*, *PMS1*, что определяет необходимость их дальнейшего изучения как причинных молекулярно-генетических изменений, приводящих к более раннему, по сравнению с общепопуляционным, развитию колоректального рака.

На основе молекулярно-генетического анализа разработаны и внедрены алгоритмы, позволяющие проводить раннюю диагностику и профилактику колоректального рака у лиц молодого возраста и с наследственно отягощенным анамнезом с осуществлением лечебных мероприятий и индивидуализированного наблюдения.

Практическая значимость работы:

Разработаны и внедрены алгоритмы ранней диагностики и профилактики колоректального рака у лиц в возрасте до 50 лет и с генетически отягощенным анамнезом на основе молекулярно-генетического анализа.

Разработаны и внедрены алгоритмы индивидуализированного диспансерного наблюдения за пациентами с полипозными и непалипозными синдромами и их кровными родственниками.

Усовершенствована панель мультигенного тестирования для оценки риска развития КРР в молодом возрасте.

Алгоритмы ранней диагностики и профилактики колоректального рака у лиц в возрасте до 50 лет и с генетически отягощенным анамнезом могут быть в дальнейшем использованы во всех учреждениях, оказывающих онкологическую помощь в Республике Казахстан.

Выводы:

1. В Республике Казахстан наблюдается рост заболеваемости колоректальным раком у лиц в возрасте до 50 лет. Ежегодный прирост количества случаев составляет 2.3%. Наиболее высокие стандартизованные показатели заболеваемости отмечены в Северо-Казахстанской, Павлодарской и Восточно-Казахстанской областях, наиболее низкие – в Южно-Казахстанской, Жамбылской и Кызылординской областях. При этом стандартизованный показатель в Северо-Казахстанской области в 2.2 раза превышает данный показатель в Туркестанской области и в 1.9 раза – в Кызылординской области.

2. У пациентов в возрасте до 50 лет по сравнению с пациентами старше 65 лет отмечено на 15% больше случаев местно-распространенного опухолевого процесса (III стадии). У пациентов в возрасте до 50 лет IV стадия заболевания на 27.3% чаще встречается у мужчин, чем у женщин. Выявлена тенденция увеличения частоты опухолей, локализующихся в правой половине толстой кишки с увеличением возраста пациентов.

3. В ходе исследования сформирован регистр больных колоректальным раком в возрасте до 50 лет и создан банк ДНК на базе Института генетики и физиологии МОН РК.

4. Частота патогенных мутаций в генах с высокой пенетрантностью (*APC*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *BRCA1*, *BRCA2*) достоверно выше у пациентов с наследственно отягощенным анамнезом (21.1% против 3.1%; $p=0.0002$) и первично-множественными опухолями (20.0% против 3.1%; $p=0.0004$) по сравнению с пациентами с спорадическими вариантами заболевания (3.1%). Наиболее часто патогенные мутации и варианты с делетирующим эффектом отмечены в генах, ассоциированных с синдромом Линча (13%), синдромом Ли-Фраумени (13%), семейным аденоматозным полипозом (9.67%), семейным раком молочной железы и яичников (6.4%) и в генах комплементационной группы анемии Фанкони (6.4%).

5. Идентифицированы 17 новых ранее не описанных в литературе мутаций в генах с высокой и умеренной пенетрантностью, которые необходимо валидировать в исследованиях случай-контроль как причинные изменения, приводящие к более раннему, по сравнению с общепопуляционным, развитию колоректального рака.

6. Разработаны и внедрены алгоритмы ранней диагностики и профилактики колоректального рака у лиц в возрасте до 50 лет и с генетически отягощенным анамнезом, которые необходимо использовать при наличии в семейном анамнезе КРР и КРР-ассоциированных опухолей с целью идентификации причинных мутаций и раннего выявления заболевания у кровных родственников пациента.

Личный вклад автора

Автором проанализированы интенсивные и стандартизованные показатели заболеваемости КРР в мире и в Республике Казахстан с учетом возрастного аспекта, данные электронных ресурсов онкологической службы (госпитальный и популяционный канцер-регистры, электронный регистр онкологических больных). Личный вклад автора заключается также в создании дизайна и протокола исследования, наборе и лечении пациентов, сборе материала, разработке анкеты и индивидуальной регистрационной карты, формировании базы данных и банка ДНК, анализе, обобщении и интерпретации результатов молекулярно-генетического исследования (секвенирования ДНК), статистической обработке результатов исследования.

Связь с планом основных научных работ

Исследование осуществлялось в рамках следующих научно-технических программ:

1. «Разработка эпигенетической тест-системы для диагностики колоректального рака в Казахстане» в рамках государственного заказа по бюджетной программе 055 «Научная и/или научно-техническая деятельность». Финансирование – МОН РК. Договор на выполнение научно-исследовательских работ: «Науки о жизни» № 196 от 29.04.2016 на выполнение грантовых проектов и «Интеллектуальный потенциал» № 24 от 12.02.2015. Сроки проведения исследования 2015-2017 гг.

2. «Новые молекулярно-генетические способы досимптомной диагностики и лечения ряда значимых заболеваний (Молекулярно-генетический анализ колоректального рака на основе секвенирования нового поколения)» по бюджетной программе 013 «Прикладные научные исследования в области здравоохранения». Финансирование – МЗ РК. Договора на выполнение научно-исследовательских

работ № 164/07.17 от 10.07.2017 г., № 026-17-му от 17.07.2017 г. Сроки проведения исследования 2017-2019 гг.

Апробация результатов диссертации

Результаты и основные положения диссертации представлены на следующих мероприятиях:

1. VI Съезд онкологов и радиологов Республики Казахстан «Интеграция технологий и знаний» (г. Алматы, 28 апреля 2017 г.);
2. VII Съезд онкологов и радиологов Республики Казахстан (г. Нур-Султан, 18 октября 2019 г.);
3. Международный конгресс Molecular Analysis for Personalized Therapy Congress 2019 (г. Лондон, 8 ноября 2019 г.);
4. Республиканский семинар-совещание руководителей специализированных клиничко-диагностических отделений (СКДО) онкологических диспансеров (г. Шымкент, 4 февраля 2020 г.);
5. Международная научно-практическая конференция «Форум Урал Онко 2020» (г. Екатеринбург, 12 марта 2020 г.);
6. Международная научно-практическая конференция «Онкология Казахстана: вчера, сегодня, завтра» (г. Алматы, 11 декабря 2020 г.);
7. VIII с международным участием Съезд онкологов и радиологов Республики Казахстан (г. Туркестан, 15 октября 2021 г.).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 28 работ, в том числе 7 статей в изданиях, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере образования и науки Министерства образования и науки РК, 3 статьи в зарубежных рецензируемых изданиях, индексируемых в базах научной информации Scopus и Web of Science – Tumor Biology (перцентиль 40%, Q2, импакт-фактор 2.926), South African Medical Journal (перцентиль 44%, Q2, импакт фактор 1.500), Frontiers in Oncology (перцентиль 46%, Q2, импакт-фактор 4.848), 2 тезиса в зарубежных рецензируемых изданиях, индексируемых в базах научной информации Scopus и Web of Science – FEBS Journal (Q2, импакт-фактор 3.986), Annals of Oncology (перцентиль 98%, Q1, импакт-фактор 18.279), 3 тезиса в материалах международных научно-практических конференций молодых ученых, 2 статьи и 7 тезисов в материалах международных научных конференций и конгрессов.

Объем и структура диссертационной работы

Диссертация изложена на 220 страницах. Состоит из введения, 4 разделов (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение), заключения, списка использованных источников, 7 приложений. Текст содержит 31 таблицу и 64 рисунка. Список литературы включает 267 источников.