

Molekulová biológia kolorektálneho karcinómu z pohľadu patológa

MUDr. Michal Kalman

Ústav anatomickej patológie JLF UK a UNM, Martin

Kolorektálny karcinóm bol dlho považovaný za homogénnu jednotku. Avšak už na základe histomorfológie rozoznávame niekoľko subtypov karcinómov, ktoré sa vzájomne líšia aj na molekulovo-genetickej úrovni. Prepojenie poznatkov z histomorfológie a molekulovej genetiky viedlo k objaveniu dvoch základných dráh karcinogenézy. Približne 60 – 80 % KRK vzniká z morfológicky klasického adenómu prostredníctvom konvenčnej supresorovej dráhy karcinogenézy a vyznačuje sa statusom mikrosatelitovej stability (MSS), respektíve chromozómovej nestability (CIN). Veľká časť zostávajúcich karcinómov vzniká zo „serátnych“ adenómov takzvanou „serátnou“ dráhou karcinogenézy a je charakterizovaná zvýšenou frekvenciou metylácie CpG ostrovčekov (CIMP), pričom časť z nich je mikrosatelitovo nestabilná (MSI-H). Už dnes je celkom jasné, že existuje vzájomné prekrývanie medzi týmito dvoma dráhami. Snaha o zavedenie molekulovo-genetickej klasifikácie je páličivým problémom a výskum v tejto oblasti extenzívne prebieha, ale zatiaľ bez konsenzu. Tento záujem je do veľkej miery daný potrebou identifikovať kľúčové gény a genetické alterácie, ktoré sú potenciálnym cieľom na cieľnú liečbu pacientov s kolorektálnym karcinómom.

Kľúčové slová: prekursorové lézie, kolorektálny karcinóm, karcinogenéza, konvenčná dráha, serátna dráha.

Molecular biology of colorectal cancer from the perspective of the pathologist

Colorectal cancer was considered as a homogeneous entity for a long time. However, on the basis of morphology we recognize several subtypes of carcinomas which differ also at molecular genetic level. Findings from histomorphology and molecular genetic both led to discover two cardinal pathways of carcinogenesis. Approximately 60 – 80% of colorectal cancers arising via the conventional suppressor pathway with conventional adenoma give rise to microsatellite stable (MSS) or chromosomal instable (CIN) carcinoma. Most of the remainder arising via the serrated pathway, with serrated adenomas give rise to CpG island methylated carcinomas that may be microsatellite instable (MSI-H). It's quite clear today that there is overlap between pathways. Effort to introduce the molecular classification of colorectal cancer is a pressing issue and has been extensively studied however until now without consensus. This interest is in large part driven by the need to identify key genes that are potential targets for targeted therapies for colorectal cancer patients.

Key words: precursor lesions, colorectal carcinoma, carcinogenesis, conventional pathway, serrated pathway.

Úvod

Kolorektálny karcinóm (KRK) predstavuje heterogénnu skupinu zhubných epitelových nádorov vznikajúcich v hrubom čreve alebo v rekte, pričom viac ako 90 % z nich sú adenokarcinómy. Jeho výskyt bol opísaný vo všetkých vekových skupinách, deti nevyvíjajú. Kým v minulosti bol KRK ochorením prevažne ľudí starších ako 50 rokov, v posledných rokoch pozorujeme zvýšenú incidenciu tohto zhubného ochorenia u pacientov pred dovŕšením 40. roku života. V Európe je KRK tretia najčastejšie diagnostikovaná malignita a tretia najčastejšia príčina úmrtia na zhubné ochorenie (<http://globocan.iarc.fr>). Preto nie je prekvapujúce, že v dnešnej dynamicky sa rozvíjajúcej dobe molekulovej biológie ani táto oblasť nezostala nepovšimnutá. Poznatky o molekulovo-genetickej podstate kolorektálnej karcinogenézy a o špecifických genetických alteráciách majúci vplyv na klinické rozhodovanie sa začínajú stávať súčasťou základných vedomostí poskytovateľov zdravotnej starostlivosti, ktorí sa starajú o pacientov s KRK. Úloha patológa je v tomto smere kľúčová vzhľadom na to, že práve výsledky genetických vyšetrení začínajú byť súčasťou bioptického nálezu.

Karcinogenéza kolorektálneho karcinómu

Z hľadiska patogenézy môžeme KRK rozdeliť na tie, ktoré vznikajú na podklade vrodenej mutácie a sú súčasťou vrodených karcinómových syndrémov, ďalej na tie, ktoré vznikajú na podklade chronického zápalového poškodzovania sliznice v rámci dlhotrvajúceho IBD („inflammatory bowel disease“), a poslednú a najväčšiu skupinu reprezentujú sporadické karcinómy. KRK v rámci vrodených karcinómových syndrémov, kam zaraďujeme klasické formy, ako sú FAP a Lynchov syndróm, predstavujú menej než 10 % všetkých kolorektálnych karcinómov, avšak práve extenzívne štúdiá týchto jednotiek nám pomohlo porozumieť patogeneze častejších sporadických KRK. Progresia adenómu do karcinómu pozorovaná u pacientov s FAP dala základ vzniku modelu takzvanej adenóm-karcinóm sekvencie pri sporadických formách KRK, ktorý bol aj geneticky podložený Vogelsteinom et al. pred 25 rokmi (1). Avšak pomerne nedávno viaceré klinicko-patologických a molekulovo-genetických štúdií identifikovalo sporadické karcinómy, ktoré nespádajú do tohto klasického modelu, a tak musia vznikáť inou cestou,

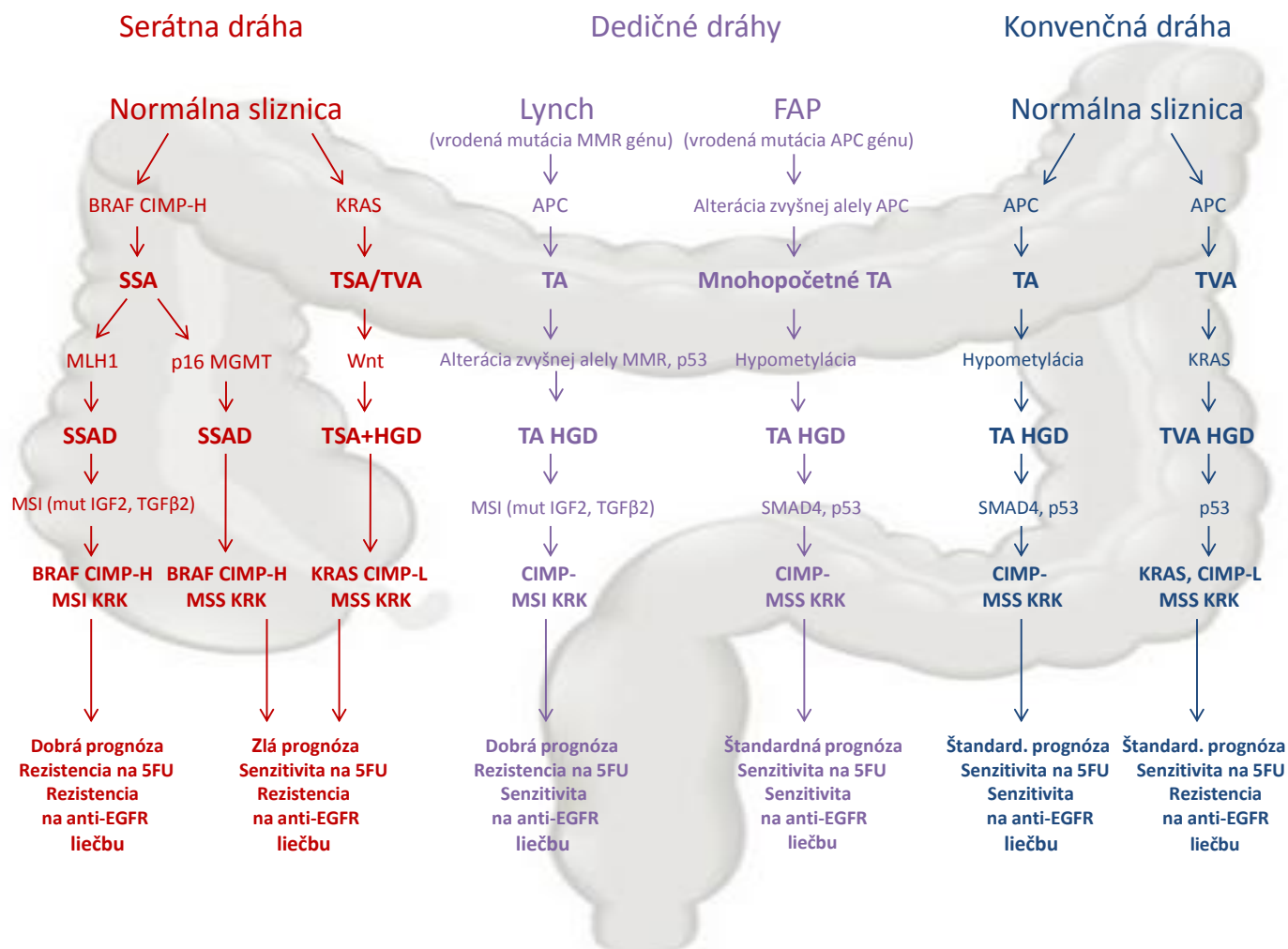
Onkológia (Bratisl.), 2014; roč. 9(5): 286–290

čím sa začala písať éra „serátnej“ dráhy karcinogenézy, do ktorej zaraďujeme aj takzvané sporadické KRK s MSI. Pri objasňovaní procesu karcinogenézy KRK bola doteraz pozornosť upriamená predovšetkým na epitelovú zložku nádoru. V poslednom období sa však čoraz častejšie objavujú publikácie vyzdvihujúce význam mikroprostredia, ktoré ovplyvňuje nádorový rast. Príkladom je nedávna štúdia medzinárodnej skupiny, ktorá poukazuje na prognostický význam intratumorálnych lymfocytov a snaží sa o implementáciu „immunoscore“ do TNM klasifikácie nádorov ako významného prognostického ukazovateľa (2).

Konvenčná dráha karcinogenézy: model adenóm-karcinóm sekvencie

Ide o dobre známy model kolorektálnej karcinogenézy navrhnutý Vogelsteinom a Fearonom, ktorý opisuje evolúciu KRK od normálnej kolonickej sliznice cez adenóm až po jeho transformáciu do karcinómu (1). Na molekulovo-biologickej úrovni sú tieto morfológické zmeny podmienené sériou genetických zmien vedúcich k mutácii alebo delícii kľúčových tumor supresorových génov a protoonkogénov. Prvotnou genetickou aberá-

Obrázok. Predpokladané dráhy karcinogenézy s výsledným genetickým statusom karcinómov a ohľadom na ich prognózu a predikciu (upravené podľa 10)



ciou v tejto konvenčnej dráhe je inaktivácia *APC* génu, ktorá je nasledovaná mutáciou génu *KRAS* a neskôr aj inaktiváciou *Tp53* tumor supresorového génu. Charakteristické pre karcinómy vznikajúce touto cestou karcinogenézy je stav aneuploidity, respektíve strata heterozyzozyty, ktorá je podmienená chromozómovou nestabilitou (CIN). Chromozómovou nestabilitou sa rozumie závažná genetická alterácia, ktorá vedie k numerickým alebo štruktúrnym zmenám chromozómov v zmysle delécie, inzercie alebo translokácie. Práve delécia kritických častí chromozómov, ako sú 5q (*APC*), 17p (*p53*) a 18q (*DCC*, *SMAD4*), zohráva významnú úlohu v progresii adenómu do karcinómu. Týmto spôsobom vzniká 60 – 80 % KRK, pričom väčšina z nich je lokalizovaná v ľavom kolone a rekte a má morfológiu konvenčného adenokarcinómu NOS.

Prekurzory adenóm-karcinóm sekvencie a ich genetické zmeny

Včasný konvenčný adenóm

Za prvotnú morfológicky detegovateľnú neoplastickú zmenu sa považujú aberantné kryp-

ty, ktoré môžu byť vo forme mikroadenómov alebo malých hyperplastických polypov. Z časti aberantných krýpt vznikajú včasné tubulárne adenómy s ľahkým stupňom dysplázie (intraepitelovej neoplázie). V oboch prekurzoroch, ako aj pri 70 – 80 % KRK, bola detegovaná mutácia *APC* génu, z čoho vyplýva, že narušenie jeho funkcie zohráva významnú úlohu v iničiálnej fáze karcinogenézy (1). Napriek tomu, že inaktivácia *APC* génu je kľúčovou pre evolúciu skorého adenómu, nie je postačujúcou pre malígnu transformáciu do karcinómu, pre vznik ktorého musí dôjsť k závažnejšej genetickej zmene. Tomu nasvedčuje aj fakt, že väčšina adenómov neprogreduje do karcinómu.

Intermediate adenóm

Predstavuje akýsi medzistupeň medzi včasným a pokročilým adenómom. Morfológicky ide zvyčajne o adenómy väčšie ako 1 cm nadobúdajúce vilóznou architektoniku pri zachovanom ľahkom stupni dysplázie (intraepitelovej neoplázie). Z genetického hľadiska sú tieto adenómy nositeľmi mutácií *KRAS* génu, ktoré sa vyskytujú pri cca 40 % KRK (3). *KRAS* proteín slúži ako pre-

nášač externých signálov z transmembránového receptora epidermálneho rastového faktora (*EGFR*) do bunky a je súčasťou signálnej dráhy mitogén aktivujúcej proteínkinázy (*MAPK*), ktorá sa podieľa na regulácii proliferácie, diferenciácie, angiogenézy a bunkovej motility (4). V prípade mutovaného *KRAS* génu zostáva defektný proteín permanentne aktivovaný, čo vedie k nekontrolovanej bunkovej proliferácii a celkovej malígnej transformácii bunky. *KRAS* mutácia sa objavuje ešte pred vznikom aneuploidity, a teda chromozómovej nestability. To stavia danú genetickú zmenu do roviny akéhosi medzistupňa progresie adenómu. Raz získaná *KRAS* mutácia zostáva nezmenená a býva zachovaná počas celého „života“ nádoru vrátane metastáz.

Pokročilý adenóm

Morfológicky ide o adenómy väčšie ako 10 mm s vilóznou architektonikou a s ťažkým stupňom dysplázie (intraepitelovej neoplázie). Charakteristická pre pokročilé adenómy je strata heterozyzozyty deléciou dlhého ramienka 18. chromozómu (18q LOH), ktorá je prítomná

v 60 – 70 % KRK. Na dlhom ramienku 18. chromozómu sú lokalizované gény z rodiny *SMAD* a gén *DCC*. Gény *SMAD2* a *SMAD4* sú súčasťou signálnej dráhy transformujúceho rastového faktora β (*TGF- β*), ktorá sa podieľa okrem iného na regulácii apoptózy a bunkovej proliferácie. *DCC* („deleted in colorectal carcinoma“) je tumor supresorový gén kódujúci transmembránový receptor zohrávajúci úlohu pri regulácii apoptózy, bunkového cyklu a bunkovej migrácie. Pôvodne bol *DCC* považovaný za veľmi dôležitý faktor v adenóm-karcinómovej sekvencii, avšak neskoršie štúdie dôležitosť jeho úlohy v tomto smere spochybňujú. Za významnú genetickú zmenu odohrávajúcu sa v poslednej fáze kolorektálnej karcinogenézy je považovaná inaktivácia tumor supresorového génu *Tp53*. Nasvedčuje tomu fakt, že alterácia *Tp53* je pozorovaná v 50 – 70 % všetkých KRK a len v 10 % adenómov. *Tp53* zohráva kľúčovú úlohu v regulácii bunkového cyklu a apoptózy a jeho mutácia vedie ku genómovej nestabilite a nekontrolovanej bunkovej proliferácii (5). Nedávna štúdia na myších modeloch preukázala vzťah inaktívovaného *p53* k invazíve kolonického nádoru, čo opäť poukazuje na kritickú úlohu *p53* v procese malígnej transformácie (6).

Serátna dráha karcinogenézy: serátny adenóm-karcinóm sekvencia

Táto dráha karcinogenézy bola objavená len nedávno a vychádza z poznatku, že nie všetky kolorektálne karcinómy vznikajú z konvenčných adenómov, ale časť z nich 15 – 20 % vzniká zo serátnych polypov, respektíve adenómov (7, 8). Na základe molekulovo-genetických analýz sa zistilo, že veľká časť prekursorových serátnych neoplázií má ako prvotnú genetickú zmenu prítomnú mutáciu *BRAF* génu. V neskoršom štádiu karcinogenézy sa objavuje metylácia CpG ostrovčekov v oblasti promotorov génov, čím dochádza k ich epigenetickej inaktivácii. Neoplázie s dokázanou prítomnosťou metylácie CpG ostrovčekov sa označujú ako CIMP pozitívne a ďalej sa rozdeľujú na základe stupňa metylácie vo vybranom paneli CIMP-génov na CIMP-High (CIMP1) a CIMP-Low (CIMP2). Pri časti „serátnych“ neoplázií metylácia vedie k vzniku mikrosatelitovej nestability (MSI) inaktiváciou *hMLH1* „mismatch repair“ (*MMR*) génu. Týmto spôsobom vzniká veľká väčšina sporadických KRK nesúcich status (MSI), kým v prípadoch Lynchovho syndrómu je to v dôsledku vrodených mutácií *MMR* génov. Mikrosatelitová nestabilita podmienená defektným *MMR* proteínom má za následok duplikáciu opakujúcich sa sekvencií DNA (označovaných ako mikrosatelity) v priebehu replikácie. Gény obsahujúce tieto mikrosatelity sú

potom náchylné na vznik mutácií. Status MSI sa stanovuje pomocou PCR analýzy použitím referenčného medzinárodne stanoveného panelu 5 mikrosatelitových markerov. V prípade alterácie dvoch a viac markerov je status mikrosatelitovej nestability označovaný ako MSI-H, ak je alterovaný len jeden marker, je označovaný ako MSI-L, a nakoniec, ak sú všetky vyšetrované markery intaktné, hovoríme o statuse MSS, respektíve mikrosatelitovej stabilite. Za mikrosatelitovo nestabilné adenokarcinómy sa dnes považujú len tie, ktoré majú status MSI-H. Skupina KRK s MSI-L sa z klinickej, biologickej a morfolologickej stránky veľmi nelíši od karcinómov s MSS a ani údaje z rozsiahlej genómovej analýzy KRK, ktorá sledovala MSI „events“, nepriesla medzi týmito dvoma skupinami fundamentálne rozdiely (9). Práve metylácia kľúčových génov (napríklad *p16*, *COX2*, *MGMT*) a MSI podmienené mutácie v ďalších génoch (napríklad *BAX*, *Axin*, *IGF2*, *TGFBII*, *MSH3*, *MSH6*) sú hnacím motorom na neoplastickú progresiu v tejto dráhe karcinogenézy.

Prekursor „serátny“ adenóm-karcinóm sekvencie a ich genetické zmeny

Hyperplastické polypy

Predstavujú skupinu pomerne častých polypov s prevalenciou 25 – 30 %, ktoré môžu vznikáť v ktorejkoľvek časti hrubého čreva, avšak častejšie bývajú lokalizované v oblasti ľavého kolonu a rekta. Väčšina týchto polypov je menšia ako 5 mm, sú teda asymptomatické, a preto bývajú náhodným nálezom pri kolonoskopii. Histomorfologicky rozlišujeme tri typy hyperplastických polypov: mikrovezikulárny, „goblet cell“ a „mucin poor“ hyperplastický polyp. Toto delenie je skôr akademické a väčšina patológov v rutinej praxi túto subklasifikáciu nepoužíva. Z genetickej stránky bola pri týchto polypoch dokázaná mutácia *BRAF* a menej často mutácia *KRAS* génu, čo poukazuje pravdepodobne na prvotné zmeny v „serátnej“ dráhe karcinogenézy. Predpokladá sa, že mikrovezikulárny variant HP je prekursorom pre pokročilejšiu „serátnu“ neopláziu, označovanú ako sesilný „serátny“ adenóm, aj keď niektorí autori túto teóriu spochybňujú (10). Podľa súčasných odporúčaní pacienti s diagnostikovaným HP nevyžadujú ďalšie sledovanie vzhľadom na ich nízky malígný potenciál (11).

Sesilné serátne adenómy (SSA)/Sesilné serátne adenómy s dyspláziou (SSA-D)

Ide o neoplázie označované aj ako sesilné serátne polypy alebo sesilné serátne lézie predstavujúce 10 % spomedzi všetkých kolo-

rektálnych polypov, ktoré bývajú predilekčne lokalizované v pravom kolone. Morfológicky ide o sesilné polypy rozličnej veľkosti s typickými architektonickými zmenami krýpt v spojitosti s poruchou maturácie epitelu, avšak bez prítomnosti dysplázie. Napriek definovaným morfológickým kritériám diagnostikovanie týchto polypov je problematické a často bývajú zamieňané za mikrovezikulárne hyperplastické polypy, z čoho vyplýva pomerne častá „interobserver“ variabilita medzi patológmi (12). Pri časti SSA dochádza k vzniku konvenčnej dysplázie a tieto lézie boli ešte nedávno označované ako zmiešané polypy (SSA + konvenčný adenóm). Ale nová štúdia na základe genetickej analýzy potvrdila klonalitu týchto neoplázií a vyvrátila fakt, že by malo ísť o kompozitný tumor. Označenie sesilný serátny adenóm s dyspláziou (SSA-D) sa preto zdá v súčasnosti adekvátne (13). Na molekulovo-genetickej úrovni bola pri SSA dokázaná častá mutácia *BRAF* génu, ktorá sa zdá kľúčová v iníciaľnej fáze nádorového procesu. Ďalšie genetické alterácie v zmysle metylácie génov ako *p16*, *MGM*, respektíve *hMLH1* boli pozorované v neskoršom štádiu progresie SSA obvykle pri tých s „high-grade“ dyspláziou. SSA obzvlášť SSA-D sú považované za biologicky agresívne prekursor s vysokým rizikom pomerne rýchlej malígnej transformácie a vyžadujú si kompletnú excíziu polypu s následným sledovaním pacienta s minimálne takou frekvenciou ako pri konvenčných adenómoch.

Tradičné serátne adenómy (TSA)

Sú veľmi zriedkavé a predstavujú približne 1 % zo všetkých kolorektálnych polypov. Bývajú lokalizované prevažne v oblasti rektosigmy, ale môžu vznikáť v ktorejkoľvek časti hrubého čreva. Väčšina z týchto polypov je väčšia ako 5 mm a má tubulo-vilóznú architektóniku s typickou morfológiou epitelu a pílovatením. Nie je zriedkavosťou, že tieto polypy môžu v časti nadobúdať architektóniku konvenčného adenómu, SSA alebo MVHP, preto ich diagnostika napriek celkom jasne definovaným kritériám nie je vždy jednoduchá a dokonca nemusí byť ani správna (11). Z molekulovo-genetickej stránky môžu mať dané polypy mutovaný *BRAF* alebo *KRAS* gén. Tie s *BRAF* mutáciou sú častejšie lokalizované vpravo, v pokročilom štádiu, keď sa objavuje „high-grade“ intraepitelová neoplázia a invazíva, bývajú asociované s vyšším metylačným statusom (*CIMP-H*) a *MSI-H* v dôsledku metylácie *hMLH1* (10). Naopak, väčšina ľavostranných polypov je nositeľom *KRAS* mutácie, vyznačuje sa nízkym stupňom metylácie (*CIMP-L*), pričom metyláciou býva postihnutý DNA reparačný gén

MGMT. Pokročilé neoplázie sú zvyčajne charakterizované stratou heterozygoty a chromozómovou nestabilitou (CIN).

Karcinómy vznikajúce „serátnou“ dráhou karcinogenézy

Na základe uvedených genetických zmien (*BRAF*, *KRAS*, *CIMP*, *MSI*) môžeme KRK vznikajúce „serátnou“ dráhou karcinogenézy rozdeliť do troch skupín: 1) *BRAF* mutované, *CIMP-H* (metylovaný *hMLH1*) a *MSI*; 2) *BRAF* mutované, *CIMP-H* (metylovaný *MGMT*, *p16*) a *MSS*; 3) *KRAS* mutované, *CIMP-L* a *MSS* (7). Prvá skupina KRK je charakterizovaná prítomnosťou *BRAF* mutácie, *CIMP-H* (metylovaný *hMLH1*) a *MSI-H*. Tieto karcinómy vznikajú zo SSA a bývajú lokalizované v oblasti céka a kolon ascendens s častejšou incidenciou u starších žien. Sú zvyčajne diagnostikované v pokročilom štádiu lokálneho rastu, avšak s nízkou frekvenciou uzlinových a orgánových metastáz, čo predpovedá ich dobrú prognózu. Morfológicky ide o mucinózne alebo zle diferencované karcinómy s expanzívnym rastom a peritumorálnou a intratumorálnou zápalovou reakciou. Tieto morfológické znaky sú asociované s *MSI* pri sporadických formách KRK, ako aj v rámci Lynchovho syndrómu, identifikácia *BRAF* mutácie v tomto prípade vylúči možnosť Lynchovho syndrómu. Druhá skupina má genetický profil charakterizovaný *BRAF* mutáciou, *CIMP-H* (metylovaný *MGMT*, *p16*) a *MSS*. Tieto karcinómy vznikajú taktiež zo SSA a rovnako bývajú častejšie lokalizované v oblasti pravého kolonu. Morfológicky ide opäť o mucinózne alebo zle diferencované konvenčné adenokarcinómy, okrem toho do tejto skupiny spadá aj časť karcinómov z prstencových buniek a nedávno opísaný kribiformný-komedo typ karcinóm. Charakteristický je infiltratívny rast s vysokým stupňom „tumor budding“ a lymfo-vaskulárnou inváziou s častejším postihnutím lymfatických uzlín, z čoho vyplýva ich horšia prognóza. Tretia skupina je kontroverzná a mohla by predstavovať akýsi hybrid medzi „serátnou“ a konvenčnou dráhou karcinogenézy (11, 14). Na molekulovo-genetickej úrovni sú tieto karcinómy *MSS*, majú *KRAS* mutáciu a nízky stupeň metylácie (*CIMP-L*), pričom metylovaným býva často DNA opravný *MGMT* gén. Prekursorom pre karcinómy s týmto genetickým profilom sa zdá TSA a TVA, ktoré môžu progredovať do adenokarcinómov s mucinóznou diferenciáciou alebo do „serátnych“ adenokarcinómov predstavujúcich nový histologický subtyp v rámci poslednej WHO z roku 2010. Serátne adenokarcinómy sú definované na základe histomorfologických kritérií, ktoré boli stanovené Mäkinenom et al. (15). Tieto karcinómy sa častejšie vyskytujú u žien a približne po-

lovica z nich vzniká v oblasti pravého kolonu a asi tretina v oblasti rekta. Nedávna štúdia poukazuje na ich zlú prognózu v porovnaní s konvenčnými karcinómami (16).

Prínos poznatkov kolorektálnej karcinogenézy pre klinickú prax

Na základe lokality a morfológie KRK môže predpokladať ich genetický status, ktorý má vplyv na prognózu ochorenia. Taktiež vypovedá aj o možnej rezistencii alebo senzitivite na liečbu. Práve poznatky karcinogenézy na molekulovej úrovni viedli a vedú k vývoju nových liekov, ktoré cielene ovplyvňujú jednotlivé kľúčové gény a efektovej signálnych dráh.

Mikrosatelitová nestabilita (*MSI-H*)

Adenokarcinómy s *MSI-H* predstavujú 10 – 15 % všetkých KRK a sú prevažne lokalizované v pravom kolone. Stanovovanie *MSI-H* má niekoľko klinických významov, v prvom rade slúži ako skriningový marker pri pátraní po pacientoch s Lynchovým syndrómom (LS), vzhľadom na to, že viac ako 90 % KRK v rámci LS je *MSI*. Na odlišenie LS od sporadickej formy KRK s *MSI-H* je nutné testovať prítomnosť *BRAF* mutácie a prípadne metylácie *hMLH1*, ktoré sa v 99 % prípadov LS nevyskytujú, a až potom by malo nasledovať pátranie po vrodených mutáciách *MMR* génov. Stratifikácia pacientov s KRK na *MSI-H* a *MSS* sa ukázala dôležitou aj z hľadiska prognózy. Nedávna metaanalýza skúmajúca údaje z 31 štúdií týkajúcich sa prežívania u 12 782 pacientov potvrdila pôvodné pozorovania medzi *MSI-H* statusom a lepšou prognózou. Pacienti v I. – IV. štádiu s *MSI-H* KRK mali štatisticky signifikantne lepšiu prognózu týkajúcu sa celkového prežívania, ako aj obdobia bez choroby (17). Význam *MSI-H* statusu ako prediktívneho markera sa zdala zo začiatku menej jasná, avšak viacero neskorších štúdií preukázalo, že pacienti s *MSI-H* KRK nemali benefit z liečby 5-FU (18).

18qLOH

Delécia dlhého ramienka 18. chromozómu je pomerne častá a vyskytuje sa v 70 % KRK, ktoré sú lokalizované prevažne vľavo a vznikajú konvenčnou dráhou karcinogenézy. Úloha *18qLOH* ako prognostického markera dodnes nie je úplne objasnená, rovnako ako aj jeho prediktívny význam, a preto v súčasnosti nebol implementovaný do klinickej praxe ako biomarker (19).

KRAS

Patrí do skupiny *RAS* protoonkogénov (spolu s *NRAS* a *HRAS*) a je súčasťou MAPK signálnej dráhy, na začiatku ktorej stojí EGF receptor. Mutácie

KRAS génu sú považované za negatívny prediktívny marker liečby monoklonálnymi anti-EGFR protilátkami (cetuximab, panitumumab). V prípade nemutovaného *KRAS* génu sa v súčasnosti odporúča testovanie na prítomnosť mutácie ďalšieho z rodiny *RAS* onkogénov, a to *NRAS* génu, ktorý je mutovaný pri 2 – 10 % KRK. Aktivovaný *KRAS* podporuje bunkovú proliferáciu a vedie k supresii diferenciácie, kým aktivovaný *NRAS* potláča apoptózu vo vznikajúcom tumore (19). *KRAS* ani *NRAS* nie sú v súčasnosti považované za prognostické markery.

BRAF

Mutácia *BRAF* génu sa objavuje pri 10 – 20 % KRK a vedie k aberantnej aktivácii MAPK signálnej dráhy. *BRAF* mutácia je v prvom rade považovaná za negatívny prognostický faktor, ktorý vedie u pacientov s mutovaným *BRAF* KRK k signifikantne kratšiemu prežívaniu bez progresie, ako aj celkovému prežívaniu oproti tým, ktorí majú *BRAF* nemutovaný (20, 21). Avšak na podklade niektorých štúdií je negatívny prognostický efekt *BRAF* mutácie zmiernený v prítomnosti mikrosatelitovej nestability (*MSI-H*) (22). Pohľad na *BRAF* ako prediktívny faktor je kontroverzný. Kým niektoré štúdie poukazujú na jeho úlohu prediktora v liečbe monoklonálnymi anti-EGFR protilátkami, iné toto tvrdenie vyvracajú (23). V súčasnosti NCCN odporúča testovanie *BRAF* mutácie v prípade *KRAS* WT, v našich podmienkach sa zatiaľ netestuje.

Tp53

Tp53 je kľúčovým a jedným z najčastejšie mutovaných a extenzívne prebádaných tumor supresorových génov. Testovanie *p53* ako prognostického markera pre heterogénne výsledky mnohých štúdií sa v súčasnosti neodporúča. Rovnako sa nepreukázal význam *p53* ako prediktívneho biomarkera (23, 24).

Fenotyp metylovaných CpG ostrovčekov (*CIMP-H*)

Charakterizuje skupinu KRK vznikajúcich prevažne serátnou dráhou karcinogenézy v proximálnej časti hrubého čreva, ktoré sa vyznačujú zvýšeným metylačným statusom často v asociácii s *BRAF* mutáciou a *MSI-H*. Výsledky štúdií skúmajúcich vzťah *CIMP-H* k prognóze sa v rozličných štádiách ochorenia rozchádzajú, a preto jeho význam ako prognostického a prediktívneho biomarkera ostáva nejasný (24). Dodnes neboli jednoznačne definované kritériá na determináciu *CIMP* statusu, čo vysvetľuje aj heterogenitu výsledkov v rôznych štúdiách.

Záver

V súčasnosti úlohou patológa nie je len správne stanovenie diagnózy z vyšetrovaného tkaniva, ale jeho pozornosť je upriamená aj na identifikáciu prognostických a prediktívnych faktorov za účelom dosiahnutia čo najlepšieho klinického manažmentu pacienta. Kým parametre s vysokou prognostickou hodnotou (pTNM, vaskulárna invázia) sú hodnotené klasickým histomorfologickým vyšetrením, stanovovanie prediktívnych markerov je doménou molekulo- genetického vyšetrenia. Dnes sú v našich podmienkach do klinickej praxe štandardne zavedené dva molekulo- genetické testy zamerané na prítomnosť *KRAS* a *NRAS* mutácie a je veľmi pravdepodobné, že v blízkej budúcnosti bude paleta týchto vyšetrení pestrejšia. Poznanie karcinogenézy na morfolologickej aj genetickej úrovni nám umožňuje lepšie porozumieť KRK ako celku, v ktorom zohrávajú významnú úlohu kľúčové gény a genetické alterácie vo vzájomnej interakcii. Rozvíjajúca sa oblasť molekulovej genetiky a príchod nových a čoraz dostupnejších technológií nám umožňuje ešte detailnejší pohľad na molekulovú biológiu KRK a prináša enormné množstvo informácií, ktoré sú výzvou pre bioinformatikov na odhalenie potenciálnych biomarkerov. Avšak netreba zabúdať, že tieto informácie budú dávať zmysel iba za predpokladu adekvátnej klinicko- patologickej korelácie.

Práca bola podporená grantom MZ SR č. 2012/24-UKMA-1.

Literatúra

1. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Smits A, Bos JL. Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *N Engl J Med*. 1988; 319:525–532.

2. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol*. 2014;232:199–209.
3. Ishii T, Notohara K, Umaphathy A, et al. Tubular adenomas with minor villous changes show molecular features characteristic of tubulovillous adenomas. *Am J Surg Pathol*. 2011;35:212–220.
4. Zavodna K, Konecny M, Krivulcik T, Spanik S, Behulova R, Vizvaryova M, Weismanova E, Galbavy S, Kausitz J. Genetic analysis of *KRAS* mutation status in metastatic colorectal cancer patients. *Neoplasma*. 2009;56(3):275–278.
5. Bargonetti J, Manfredi JJ. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol*. 2002;14(1):86–91.
6. Elyada E, Pribluda A, Goldstein RE, Morgenstern Y, Brachya G, Cojocaru G, Snir-Alkalay I, Burstain I, Haffner-Krausz R, Jung S, et al. CK1alpha ablation highlights a critical role for p53 in invasiveness control. *Nature*. 2011;470(7334):409–413.
7. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007;50:113–130.
8. Snover DC. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum Pathol*. 2011;42:1–10.
9. Kim TM, Laird PW, Park PJ. The landscape of microsatellite instability in colorectal and endometrial cancer genomes. *Cell*. 2013;155(4):858–868.
10. Bettington M, Walker N, Clouston A, et al. The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology*. 2013;62:367–386.
11. Bateman AC. Pathology of serrated colorectal lesions. *J Clin Pathol*. 2014; Doi: 10.1136/jclinpath-2014-202175.
12. Gill P, Wang LM, Bailey A, et al. Reporting trends of right-sided hyperplastic and sessile serrated adenomas in a large teaching hospital over a 4-year period (2009 – 2012). *J Clin Pathol*. 2013;66:655–658.
13. Rau TT, Nagtegaal ID, Rüschoff J, Vieth M, et al. Defined morphological criteria allow reliable diagnosis of colorectal serrated polyps and predict polyp genetics. *Virchows Arch*. 2014;464(6):663–672.
14. Minoo P. Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of MGMT. *Front Oncol*. 2013;18(3):266.
15. Mäkinen MJ. Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology*. 2007 Jan;50(1):131–150.
16. Garcia-Solano J, Conesa-Zamora P, Makinen MJ, et al. Tumour budding and other prognostic pathological features at invasive margins in serrated colorectal adenocarcinoma: a comparative study with conventional carcinoma. *Histopathology*. 2011;59:1046–1056.
17. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, et al. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to

therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer*. 2010;46:2788–2798.

18. Sargent DJ, Marsoni S, et al. Defective Mismatch Repair As a Predictive Marker for Lack of Efficacy of Fluorouracil-Based Adjuvant Therapy in Colon Cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:3219–3226.
19. Sagaert X. Prognostic biomarkers in colorectal cancer: where do we stand? *Virchows Arch*. 2014;464:379–391.
20. Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101:1308–1324.
21. Bokemeyer C, Van Cutsem E, et al. Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. *Eur J Cancer*. 2012;48:1466–1475.
22. Lochhead P, Kuchiba A, Imamura Y, et al. Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105:1151–1156.
23. Lipton L, Christie M, Sieber O. Prognostic and predictive biomarkers for colorectal cancer. In: Pfeffer U. *Cancer Genomics: Molecular Classification, Prognosis and Response Prediction*. Dordrecht: Springer; 2013: 131–162.
24. Church DN, Midgley RS, Kerr DJ. Colorectal cancer. In: Giordano A, Bologna M. *Biotargets of Cancer in Current Clinical Practice*. New York: Springer: Humana press; 2012: 245–272.

MUDr. Michal Kalman

Ústav anatomickej patológie JLF UK
Univerzitná nemocnica Martin
Kollárova 2, 036 59 Martin
kalman@mfn.sk

