

УДК:616.345-006.6-056.7-07

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННОГО НЕПОЛИПОЗНОГО РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ

**Г.А. Янус^{1,2}, А.В. Корнилов³, Е.Н. Суспицын^{1,2}, О.А. Зайцева², О.С. Яцук²,
Д.Л. Стрекалов², И.С. Поляков⁴, С.И. Бреништер⁵, И.В. Правосудов¹,
А.В. Гуляев^{1,6}, В.В. Семиглазов³, Е.Н. Имянитов^{2,3,6}**

*НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, г. Санкт-Петербург¹
Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия²
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург³
Кубанская медицинская академия, г. Краснодар⁴
Институт онкологии, г. Кишинёв⁵
Медицинская академия последипломного образования, г. Санкт-Петербург⁶
197758, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 68,
e-mail: evgeny@imyanyitov.spb.ru²*

На долю наследственного неполипозного рака толстой кишки (hereditary non-polyposis colorectal cancer; HNPCC) приходится 2–3 % всех случаев колоректальных карцином. Развитие данного синдрома обусловлено наличием мутации в генах, кодирующих ферменты репарации неспаренных оснований ДНК. В результате изучения 672 историй болезни больных колоректальным раком, подвергшихся хирургическому лечению в НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, на молекулярно-генетическое обследование была отобрана группа из 16 пациентов с выраженными клиническими признаками HNPCC-синдрома. На первом этапе диагностики HNPCC выполнялся тест на микросателлитную нестабильность (microsatellite instability, MSI), предусматривающий использование 3 мононуклеотидных маркеров (BAT26, BAT25 и BAT40); присутствие MSI было подтверждено в 10 из 16 случаев. Образцы ДНК нормальной ткани MSI-положительных пациентов были исследованы на предмет наличия наследственных мутаций в генах MLH1 и MSH2. Высокоточный анализ кривых плавления (high resolution melting analysis, HRMA) с последующим секвенированием аномальных фрагментов позволил выявить потенциально патогенные мутации у 5 пациентов.

Ключевые слова: наследственный неполипозный рак толстой кишки, микросателлитная нестабильность, наследственные мутации.

MOLECULAR TESTING FOR HEREDITARY NON-POLYPOSI COLORECTAL CANCER

G.A. Yanus^{1,2}, A.V. Kornilov³, E.N. Suspitsin^{1,2}, O.A. Zaitseva², O.S. Yatsuk², D.L. Strekalov², I.S. Polyakov⁴, S.I. Brenister⁵,
I.V. Pravosudov¹, A.V. Guliaev^{1,6}, V.V. Semiglazov³, E.N. Imyanitov^{2,3,6}

*N.N. Petrov institute of Oncology, St.-Petersburg¹
St.-Petersburg Pediatric Medical Academy²
I.P. Pavlov Medical University, St.-Petersburg³
Kuban Medical Academy, Krasnodar⁴
Institute of Oncology, Kishinev⁵
Medical Academy for Postgraduate Studies, St.-Petersburg⁶
68, Leningradskaya Street, 197758-St.-Petersburg, Russia, e-mail: 68, e-mail: evgeny@imyanyitov.spb.ru²*

Hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) contributes to 2–3 % of colorectal cancer incidence and is caused by mutations in the DNA mismatch genes. We considered 672 clinical records for colorectal cancer patients, who underwent surgical treatment in the N.N. Petrov Institute of Oncology (St.-Petersburg, Russia). 16 cases with single or multiple clinical features of the HNPCC were selected for the microsatellite instability (MSI) testing by BAT26, BAT25 and BAT40 mononucleotide markers, and 10 MSI+ tumors were revealed. Normal tissues from these patients were analyzed by high resolution melting analysis (HRMA) and DNA sequencing for the presence of mutations in MLH1 and MSH2 genes. Potentially pathogenic mutations were identified in 5 out of these patients.

Key words: hereditary non-polyposis colorectal cancer, microsatellite instability, hereditary mutations.

Рак толстой кишки (РТК) занимает пятое-шестое место в структуре онкологической заболеваемости [2, 3]. Около 5 % РТК имеют наследственную природу [5]. Наиболее характерными формами наследственного РТК являются семейный аденоматозный полипоз (FAP, familial adenomatous polyposis) и так называемый синдром Линча (наследственный неполипозный рак толстой кишки, hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC). Встречаемость HNPCC в некоторых популяциях достигает значений 1:500–1:1000 [1, 17], что делает этот синдром одним из самых частых наследственных заболеваний. Средний возраст развития колоректального рака при HNPCC составляет около 45 лет [11]. В основе патогенеза данного синдрома лежит нарушение системы репарации неспаренных оснований ДНК. В опухолевых клетках дефект репарации проявляется в виде нестабильности длины микросателлитных повторов (так называемой микросателлитной нестабильности, microsatellite instability, MSI) [5, 24, 25].

К настоящему времени идентифицировано 4 гена, достоверно ассоциированных с развитием синдрома Линча: hMLH1, hMSH2, hMSH6 и hPMS2. Основная доля мутаций (около 90 %) приходится на гены hMLH1 и hMSH2, тогда как hMSH6 и PMS2 вовлекаются относительно нечасто и, как правило, ассоциированы с менее выраженным семейным анамнезом [16]. В редких случаях синдром Линча связан с делецией 3'-концевой последовательности гена TACSTD1 (EPCAM). Следует отметить, что перечисленные выше мутации обнаруживаются далеко не у всех пациентов с HNPCC, поэтому усилия исследователей направлены на идентификацию новых генов предрасположенности к раку толстой кишки [14].

Диагностика наследственного неполипозного РТК представляет собой сложную задачу и складывается из тщательного анализа семейной истории с последующим проведением ДНК-тестирования. Первым этапом молекулярно-генетической диагностики обычно является анализ образца опухолевой ткани, полученной в ходе операции, на предмет наличия микросателлитной нестабильности. Согласно данным литературы, тест на MSI оказывается положительным более чем в 90 % случаев синдрома Линча [24]. Примерно в 8–15 % sporadических случаев колоректального рака MSI-тест также может быть позитивным и поэтому не

является абсолютным признаком наследственного заболевания.

Целью исследования является оценка спектра наследственных мутаций в генах MMR у пациентов с MSI-положительными РТК, соответствующих клиническим критериям HNPCC.

Материал и методы

Работа основана на ретроспективном анализе данных историй болезни 672 первичных больных раком ободочной кишки, подвергшихся хирургическому лечению в НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова (г. Санкт-Петербург) в период с 1999 по 2009 г. В этой группе у 653 (97,2 %) больных выявлялась одна опухоль, оставшиеся 19 (2,8 %) пациентов страдали первично-множественными новообразованиями ободочной кишки. Возраст на момент диагноза составлял от 19 до 85 лет. Подавляющее большинство больных находилось в возрастной группе старше 50 лет (88,4 %). Отмечалось некоторое преобладание женщин, доля которых составила 63 % (425 человек).

Все опухоли были представлены аденокарциномами различной степени злокачественности. У 370 (55 %) пациентов новообразования обладали умеренной, у 100 (15 %) – высокой, у 168 (25 %) – низкой степенью дифференцировки. В 34 (5 %) случаях наблюдался недифференцированный рак. Стадия опухолевого процесса определялась согласно Международной классификации злокачественных опухолей по системе TNM (2003). У 295 (44 %) больных диагностирована I–II стадии, у 377 (56 %) – III–IV стадии РТК.

Выделение ДНК. В случае использования архивного патоморфологического материала срезы толщиной 15 мм депарафинизировались в двух сменах ксилола по 5 мин. Затем образцы промывались в двух сменах 96 % этанола по 2 мин. После тщательного удаления этанола к тканям добавлялся лизирующий буфер (10 мМ Tris-HCl (pH=8,0), 0,1 мМ ЭДТА; pH=8,0, 2 % натрия додецилсульфат) и протеиназа К (20 мг/мл). Инкубация образцов проводилась при 60°C в течение 8–16 ч до полного лизиса тканей. Далее проводилась фенол-хлороформная экстракция. К лизату добавлялся однократный объем нейтрального фенола и 0,3 объема смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1). После интенсивного встряхивания пробирки в течение 10 мин проводилось центрифугирование при 15000 г в течение 20 мин. Затем надосадочная

жидкость отбиралась в чистые пробирки, в которые добавляли 0,1 объема 3 М ацетата натрия (рН=4,0) и 0,3 объема хлороформа. После интенсивного встряхивания образцы центрифугировались при 15000 г в течение 20 мин. Супернатант отбирался в чистые эппендорфы; после добавления гликогена (20 мг/мл) и 1 объема холодного изопропанола образцы подвергались длительному (3 ч и более) охлаждению до -20°C . Затем пробирки центрифугировались при 15000 г в течение 30 мин. Изопропанол удалялся, а полученный осадок однократно промывался в 70 % этаноле в течение 10 мин. После тщательного удаления этанола осадок подсушивался в термостате при 40°C , а затем растворялся в 30 мкл стерильной воды при 65°C . Раствор ДНК хранился при -20°C до использования в ПЦР. Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови проводилось посредством модифицированного соль-хлороформного метода [18].

Анализ микросателлитной нестабильности. Микросателлитная нестабильность выявлялась при помощи квазимономорфных мононуклеотидных маркеров BAT25, BAT26 и BAT40 [5, 7, 12]. Использовались следующие пары праймеров: BAT25: TCGCCTCCAAGAATGTAAGT и TCTGCATTTAАСТАТGGСТC; BAT26: TGAСТАСТТТGACTTCAGCC и AACCAТTCAACATTTTAAССC; BAT40: ATTAACТTССТACACCACAAC и GTA-GAGCAAGACCACСТTGTCTC. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась в конечном

объеме 10 мкл. Каждая реакция содержала 1 мкл раствора ДНК, 0,5 ед. термостабильной ДНК-полимеразы, 1х ПЦР-буфер (рН 8,3), 2,5 мМ MgCl_2 , 200 мкМ каждого из четырех нуклеотидтрифосфатов, 0,3 мкМ прямого и обратного праймеров. Использовались следующие условия реакции: стартовая 10-минутная активация Taq-полимеразы при 95°C ; 45 циклов амплификации (денатурация: 15 сек при 95°C ; отжиг: 30 сек при 60°C ; элонгация 30 сек при 72°C). Полученный продукт разделяли методом электрофореза в 15 % полиакриламидном геле. Позитивным (MSI+) считался образец, демонстрирующий изменение длины одной или нескольких микросателлитных последовательностей. Наличие феномена микросателлитной нестабильности (рис. 1) служило критерием отбора для дальнейшего генетического анализа.

Анализ мутации BRAF V600E. Детекция замены V600E в гене BRAF проводилась методом аллель-специфической ПЦР с использованием праймеров GGTGATTTTGGTCTAGCTACAGT (аллель дикого типа), GGTGATTTTGGTCTAGCTACAGA (мутантный аллель) и ATAGCCTCAATCTTACCATCC (общий праймер). ПЦР в режиме реального времени проводилась на оборудовании iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) и состояла из 50 циклов (денатурация: 15 сек при 95°C ; отжиг: 30 сек при 63°C ; синтез: 30 сек при 72°C). Каждая ПЦР-реакция (суммарный объем 20 мкл) содержала 1 мкл раствора ДНК, 1 ед. ДНК-полимеразы, 1-кратный ПЦР-буфер (рН 8,3), 2,5 мМ MgCl_2 , 200 мкМ каждого из нуклеотидтрифосфатов, 0,3 мкМ каждого праймера и 0,2х SYBR green I.

Анализ мутаций в генах hMLH1 и hMSH2. Выявление мутаций в кодирующих последовательностях генов hMLH1 (экзоны 1–19) и hMSH2 (экзоны 1–16) проводилось при помощи комбинации методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и высокоразрешающего анализа кривых плавления ДНК (high resolution melting analysis, HRMA). Последовательности праймеров для проведения ПЦР-HRMA приведены в табл. 1.

ПЦР с анализом кривых плавления проводили на приборе Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). В качестве флуоресцентного красителя использовали 1X раствор EvaGreen. Условия реакции для амплификации всех экзонов были одинаковыми: 95°C 10 мин, 55 циклов 95°C 15 сек/ 60°C

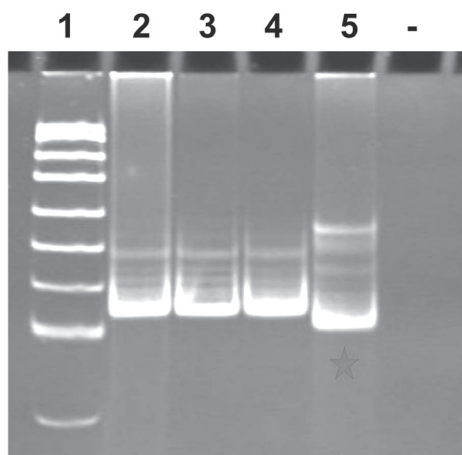


Рис. 1. Микросателлитная нестабильность по маркеру BAT-26:

1 – маркер молекулярного веса; 2–4 – образцы без микросателлитной нестабильности; 5 – образец с микросателлитной нестабильностью (пациент 16); – – негативный контроль

Таблица 1

Праймеры для ПЦР и высокоточного анализа кинетики плавления ДНК

Название праймера	Последовательность 5'-3'	Размер фрагмента, п.н.
MLH1ex1_F	CTCCGTTGAGCATCTAGAC	184
MLH1ex1_R	CCCGGCTCGACTCCCTC	
MLH1ex2_F	CATTAGAGTAGTTGCAGACTG	184
MLH1ex2_R	CCATGAAGCGCACAAACATC	
MLH1ex3_F	CTCATCTTTTTGGTATCTAACAG	151
MLH1ex3_R	TTTACACATTTCTTGAATCTTTAG	
MLH1ex4_F	GGTGAGGTGACAGTGGGTG	167
MLH1ex4_R	TATGAGTAAAAGAAGTCAGCAC	
MLH1ex5_F	TCTCTCTACTGGATATTAATTTG	160
MLH1ex5_R	TCTCCCATGTACCATTCTTAC	
MLH1ex6_F	GCTTTTGCCAGGACATCTTG	186
MLH1ex6_R	CAAATCTCAGAGACCCACT	
MLH1ex7_F	GCTCTGACATCTAGTGTGTG	127
MLH1ex7_R	CCCCATAAACCAAGAACTTAC	
MLH1ex8_F1	CAGCCATGAGACAATAAATCC	142
MLH1ex8_R1	CATACCGACTAACAGCATTTTC	
MLH1ex8_F2	CAATGCCTCAACCGTGGAC	150
MLH1ex8_R2	ACACATAATATCTTGAAAGGTTTC	
MLHex9_F	CTGATTCTTTTGTAATGTTTGAG	204
MLH1ex9_R	TTCCCATGTGGTTCTTTTTAAC	
MLH1ex10_F	CCCCTCAGGACAGTTTGTAA	161
MLH1ex10_R	AGGAGTTTGGTGCTACATTA	
MLH1ex11_F	CACTATCTAAGGTAATTGTTCTC	235
MLH1ex11_R	CAAAGGCCCCAGAGAAGTAG	
MLH1ex12_2_F	GACTTGCTGGCCCCCTCTG	138
MLH1ex12_2_R	GAAATGCATCAAGCTTCTGTTC	
MLH1ex12_3_F	CCAGATGGTTCGTACAGATTC	139
MLH1ex12_3R	AGTTCAAGCATCTCCTCATCT	
MLH1ex12_4_F	CTAGGCAGCAAGATGAGGAG	139
MLH1ex12_4_R	CTGGGGTTGCTGGAAGTAG	
MLH1ex12_5_F	TGGAGGGGGATACAACAAAG	175
MLH1ex12_5_R	AGTCAGGCAGAGAGAAGATG	
MLH1ex13_F	GATCTGCACTTCCTTTTCTTC	199
MLH1ex13_R	GCAGGCCACAGCGTTTAC	
MLH1ex14_F	GTAGGATTCTATTACTTACCTG	194
MLH1ex14_R	GTAGCTCTGCTTGTTACACAC	
MLH1ex15_F	CCCAACTGGTTGTATCTCAAG	210
MLH1ex15_R	CAAATAAGATATTAGTGGAGAGC	
MLH1ex16_1F	TCTTGGGAATTCAGGCTTCAT	195
MLH1ex16_1R	GCCTTCTTCTTCAGAAACTCA	
MLH1ex16_F2	AGAGGAAGATGGTCCCAAAG	124
MLH1ex16_R2	GTATAAGAATGGCTGTACAC	

Продолжение таблицы 1

MLH1ex17_F	CATTATTTCTGTCCCTTGTC	167
MLH1ex17_R	ACCGAAATGCTTAGTATCTGC	
MLH1ex18F	GAGGTATTGAATTTCTTTGGAC	155
MLH1ex18R	TGCATCACCCTGTACCTG	
MLH1ex19_F1	CAAACAGGGAGGCTTATGAC	230
MLH1ex19_R2	CCCACAGTGCATAAATAACCA	
MSH2ex1_1F	AACCAGGAGGTGAGGAGGT	215
MSH2ex1_1R	TCACCCCTGGGTCTTGAA	
MSH2ex1_2F	CGACCGGGGCGACTTCTA	162
MSH2ex1_2R	TCCCCAGCACGCGCCGT	
MSH2ex2_1F	GCAGCATGAAGTCCAGCTAA	164
MSH2ex2_1R	CTCTATACTGACGAACCAGAA	
MSH2ex2_2F	GATCTTCTTCTGGTTTCGTC	124
MSH2ex2_2R	GGGGGTAAATTA AAAAGGAAGA	
MSH2_ex 3_1F	GGGGGAGTATGTTCAAGAGT	145
MSH2_ex 3_1R	GACATTTTAACACCCACAACAC	
MSH2_ex 3_2F	AACAATGATATGTCAGCTTCCA	130
MSH2_ex 3_2R	TATCAGGGAATTCACACAGTC	
MSH2ex3_3F	GGATTCCATACAGAGGAACT	125
MSH2ex3_3R	CTCCTCTATCACTAGACTCAA	
MSH2ex4_1F	TGTAGGTGAATCTGTTACTACT	185
MSH2ex4_1R	GTTGAGGTCCTGATAAATGTC	
MSH2ex4_2F	GGGATAATTC AAAGAGGAGGA	176
MSH2ex4_2R	GGGGTTCACATTTATAATCCAT	
MSH2_ex5_1_F	ATCCAGTGGTATAGAAATCTTC	174
MSH2_ex5_1_R	GACTGCTGCAATATCCAATTTTC	
MSH2_ex5_2_R	CATCACTGTCTGCGGTAATC	230
MSH2_ex5_F2	TATAAGCTTCTTCAGTATATGTC	
MSH2ex6_1F	CTAATGAGCTTGCCATTCTTTC	178
MSH2ex6_1R	CTCTCCTCTATTCTGTTCTTAT	
(m13)MSH2ex6_2F	TGTA AACGACGCGCCAGTGTGGATTAAGCAGCCTCTCA	129
(m13)MSH2ex6_2R	AGCGGATAACAATTTACACAGGGCAGGTTACATAAAAC TAACGA	
MSH2ex7_1F	GAGACTTACGTGCTTAGTTGA	195
MSH2ex7_1R	TGCTTGTCTTTGAACTTCTTG	
MSH2_ex 7_2F	CCCAGATCTTAACCGACTTG	177
MSH2_ex 7_2R	AGTATATATTGTATGAGTTGAAG	
MSH2_ex 8_F	GGGGGAGATCTTTTATTTGT	162
MSH2_ex 8_R	TATTGCATACCTGATCCATATC	
MSH2ex9F	TTGTCACTTTGTTCTGTTTGC	176
MSH2ex9R	TATCCAACCTCCAATGACC	
MSH2ex10_1F	AATGGTAGTAGGTATTTATGGAA	126
MSH2ex10_1R	CCTTACAGGTTACACGAAAGT	

MSH2ex10_2F	GCACAGTTGGATATTACTTTC	173
MSH2ex10_2R	ATCATGTTAGAGCATTTAGGGA	
MSH2ex11F	GTACACATTGCTTCTAGTACA	200
MSH2ex11R	CAGGTGACATTCAGAACATTA	
MSH2ex12_1F	GTATTCCTGTGTACATTTCTG	174
MSH2ex12_1R	TTCTTCCTTGTCTTTCTCCA	
MSH2ex12_2F	ACGTGTCAAATGGAGCACCT	207
MSH2ex12_2R	CCCACAAAGCCCAAAAACCA	
MSH2ex13_1F	CATCAGTGACAGTTTAGGAC	207
MSH2ex13_1R	CAGTCCACAATGGACACTTC	
MSH2ex13_2F	GTGCCATGTGAGTCAGCAG	183
MSH2ex13_2R	CTCACAGGACAGAGACATAC	
MSH2_ex14_1F	TATGTGATGGGAAATTCATGTA	143
MSH2_ex14_1R	TGTTGCAATGTATTCTGATATAG	
MSH2_ex14_2F	TTTGGGTAGCATGGGCTATA	136
MSH2_ex14_2R	GTGCTGTGACATGTAGATTATTA	
MSH2_ex14_3F	TGCCTTGGCCAATCAGATAC	132
MSH2_ex14_3R	CCAAGTCTGAATTTAGAGTAC	
MSH2ex15_1F	GCTGTCTCTTCTCATGCTGT	225
MSH2ex15_1R	TCTCTTTCCAGATAGCACTTC	
MSH2ex15_2F	CCCTAAGCATGTAATAGAGTG	200
MSH2ex15_2R	AACCTTCATCTTAGTGTCTG	
MSH2ex16_1F	GGGACATTCACATGTGTTCA	214
MSH2ex16_1R	CATTCATTAAGGATTTTTC	
MSH2ex16_2F	CCTTTACTGAAATGTCAGAAGAA	224
MSH2ex16_2R	ACTGACAGTTAACTACTATGGAA	

30 сек/72°C 30 секунд. Интервал плавления – с 75°C до 95°C с шагом 0,1°C, время удержания каждой температуры 10 сек. Кривые, нормализованные по уровню флуоресценции, анализировались с помощью установленного производителем программного обеспечения. Кривые плавления исследуемых образцов сравнивались с кривыми плавления ДНК здоровых доноров. Образцы ДНК, обладающие аномальной кривой плавления, были отобраны для дальнейшего анализа. Секвенирование проводилось с помощью набора GenomeLab DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, USA) согласно рекомендациям производителя. Продукт реакции после преципитации этанолом разбавлялся в 40 мкл SLS (Sample Loading Solution, Beckman Coulter, USA) и подвергался капиллярному электрофорезу в системе генетического анализа CEQ 8000 (Beckman Coulter, USA).

Результаты и обсуждение

Для молекулярно-генетического исследования были отобраны 16 пациентов, у которых молодой возраст пациентов (<50 лет) сочетался с присутствием в истории болезни сведений о семейном анамнезе HNPCC-ассоциированных заболеваний [23, 25]. Первый этап молекулярно-генетического исследования – тест на микросателлитную нестабильность (MSI) – оказался положительным у 10 из 16 исследуемых больных (63 %); при этом в 7 опухолях наблюдалось вовлечение 2 или 3 маркеров (табл. 2).

Полный анализ нуклеотидной последовательности генов репарации неспаренных оснований ДНК является очень трудоёмким и дорогостоящим мероприятием, поэтому многие исследовательские коллективы используют дополнительные критерии отбора MSI-положительных опухолей на эту

Таблица 2

Характеристика пациентов с феноменом микросателлитной нестабильности

№ образца	Возраст, лет	Наличие первично-множественных опухолей	Наследственный анамнез	MSI	Мутации
1	39	-	У бабушки – рак толстой кишки, у тети – рак молочной железы	BAT26	-
3	31	-	У бабушки по материнской линии – рак яичников, у прабабушки – рак молочной железы	BAT26	hMLH1, R226L (c.677 G>T)
5	45	Синхронный рак слепой и поперечно-ободочной кишки	У матери – метастазный РТК, у бабушки – РТК и рак эндометрия, у сестры бабушки – РТК, у брата – РТК	BAT26, BAT40	hMLH1, R659X (c.1975 C>T)
7	32	-	У отца – рак прямой кишки, у тети – рак почки	BAT25, BAT26, BAT40	hMSH2 E878fsX3 (c.2633_2634delAG)
8	44	-	У тети по материнской линии – рак желудка, у бабушки – рак прямой кишки	BAT26, BAT40	-
9	50	-	У матери – рак прямой кишки, у прабабушки – рак пищевода	BAT26, BAT40	-
11	36	-	У матери – рак прямой кишки, у бабушки – рак поджелудочной железы	BAT25, BAT26, BAT40	hMSH2, N139fsX (c.415_416delAA)
13	46	-	У отца – кардиоэзофагеальный рак, у деда – рак прямой кишки	BAT25, BAT26, BAT40	-
15	47	Синхронный рак сигмовидной и слепой кишки	У бабушки – рак тела матки	BAT40	-
16	42	-	У отца – рак желудка, у деда отца – РТК, у сестры отца – РТК и рак матки, у двоюродной сестры – рак шейки матки	BAT25, BAT26	hMSH2, A636P (c.1906 G>C)

процедуру. В частности, некоторые специалисты рекомендуют иммуногистохимический анализ опухоли на предмет экспрессии MMR-белков с последующим отбором для секвенирования только тех генов, продукты которых не выявляются соответствующими антителами. Однако мы приняли решение не использовать данный подход, так как он не лишен существенных недостатков. Например, если инактивирующая мутация не затрагивает домен стабильности белка, его экспрессия может сохраняться [15]. Другой способ дифференциальной диагностики между наследственными и спорадическими MSI-положительными карциномами предусматривает мутационный анализ гена BRAF.

Патогенез спорадических опухолей толстой кишки с микросателлитной нестабильностью влечет потерю экспрессии hMLH1, которая возникает за счет метилирования промоторной области этого гена [26]. Показано, что в таких опухолях часто встречается мутация BRAF V600E, которая никогда не обнаруживается в «истинных» (т.е. связанных с наследственными дефектами MMR) случаях HNPCC [6]. В данной работе все образцы с микросателлитной нестабильностью были проверены на наличие этой мутации, однако замена V600E не была обнаружена ни в одном случае.

Таким образом, все 10 MSI-положительных образцов были подвергнуты анализу нуклеотид-

СИБИРСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ. 2012. № 2 (50)

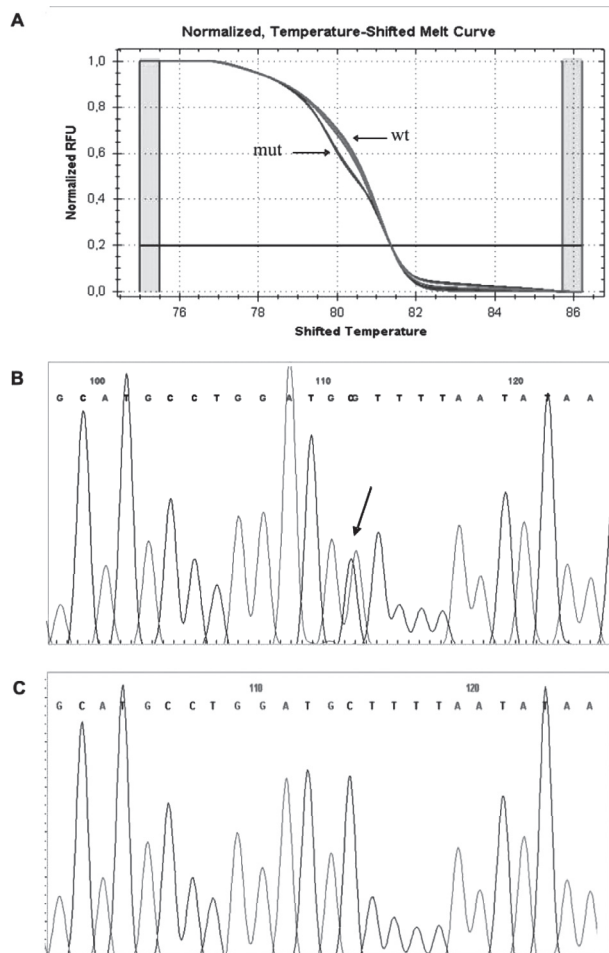


Рис. 2. Мутация A636P, пациент 16: А – высокоразрешающее плавление (HRMA) ПЦР-продукта экзона 12 гена hMSH2. mut – кривая плавления образца с мутацией; wt – кривая плавления контрольных образцов без мутации; В – нуклеотидная замена с.1906 G>C (A636P) в гене hMSH2; С – образец ДНК здорового донора

ной последовательности генов hMLH1 и hMSH2 посредством высокоточного анализа кинетики плавления ДНК с последующим секвенированием кандидатных фрагментов. Эти мутации были обнаружены у 5 из 10 пациентов (табл. 2). Важно отметить, что функциональная значимость обнаруживаемых мутаций не всегда очевидна, особенно в случае мутаций, не ведущих к появлению стоп-кодонов. Для выяснения этого вопроса, помимо литературы, использовалась информация специализированных баз данных: InSiGHT (**I**nternational **S**ociety for **G**astrointestinal **H**ereditary **T**umors) <http://www.insight-group.org/mutations/> и Mismatch Repair

Genes Variant Database <http://www.med.mun.ca/mmrvariants/>.

Мутация A636P (рис. 2) является известным «founder»-вариантом, возникшим около 200–500 лет назад в популяции евреев Ашкенази [20]. Замена аланина на пролин в АТФазном домене нарушает связывание белка с неспаренными основаниями. Это повреждение имеет популяционную частоту 0,4–0,7 % [13] и встречается более чем у 1 % не-селектированных больных раком эндометрия [4] и в 7 % случаев раннего рака толстой кишки [9]. Данная мутация многократно увеличивает риск развития колоректального рака и рака эндометрия в течение жизни, поэтому в группе евреев восточноевропейского происхождения целесообразен скрининг с целью выявления носителей. Мутация hMLH1 R226L обнаружена в ряде европейских стран. Результаты функциональных тестов и оценки *in silico* предполагают, что данная мутация может дестабилизировать конформацию белка [22]. Патогенность остальных трех обнаруженных мутаций (hMLH1 R659X, hMSH2 E878fsX3, hMSH2 N139fsX) не вызывает сомнений, так как их последствием является преждевременная терминация синтеза белка. При этом мутация в 3 экзоне гена MSH2 – N139 fsX (с.415-416delAA) ранее в литературе не описана.

Таким образом, мутации, ответственные за развитие наследственного опухолевого синдрома, выявлены в половине MSI-позитивных случаев. У остальных пациентов заболевание могло быть связано с повреждением других генов системы репарации (hMSH6, PMS2 и др.). Кроме того, нельзя исключить наличие более масштабных повреждений hMLH1 и hMSH2 (делеции и дупликации одного или нескольких экзонов), которые не могут быть детектированы секвенированием. Для проверки такой возможности необходимо применение таких методов диагностики, как MLPA (Multiple Ligation-dependent Probe Amplification).

Учитывая большие размеры России и разнообразие народностей, которые ее населяют, любопытным фактом является наличие в нашей стране выраженного «эффекта основателя». В частности, анализ BRCA мутаций у женщин с признаками наследственного рака молочной железы и яичников показал, что в различных, удаленных друг от друга регионах России преобладает одна и та же мутация – 5382insC в гене BRCA1 [18, 21].

Ожидалось, что и для пациентов с HNPCC удастся найти повторяющиеся варианты, однако в нашем исследовании все обнаруженные мутации уникальны, что можно объяснить небольшим числом наблюдений.

Конечной целью медико-генетического консультирования пациентов с HNPCC является выявление мутации, ответственной за развитие заболевания в данной семье, и разъяснение риска развития новообразований взрослым членам семьи. Если генетическое повреждение выявлено у больного, становится возможным пресимптоматическое тестирование ближайших родственников на предмет наследования этой мутации. При обнаружении мутации можно говорить о чрезвычайно высокой вероятности развития опухолевого синдрома (не менее 80 %) в течение жизни [19]. Поэтому таким лицам необходимо рекомендовать комплекс мероприятий, направленных на максимально раннюю диагностику опухолей HNPCC-спектра. Оправданным является проведение колоноскопии (раз в 1 или 2 года), начиная с 25-летнего возраста, а у женщин – УЗИ матки с 30–35 лет [11]. Кроме того, при лечении пациентов с HNPCC следует учитывать некоторые особенности течения заболевания, такие как относительно благоприятный прогноз, небольшая вероятность метастазирования, низкая чувствительность к терапии фторпиридинами и хороший ответ на лечение иринотеканом [8, 10].

Генетическая диагностика наследственного неполипозного рака толстой кишки в настоящее время представляет собой непростую задачу. Сложности связаны с целым рядом факторов (большое количество генов, ассоциированных с развитием синдрома; необходимость анализа всей последовательности этих генов; отсутствие выраженного «эффекта родоначальника»). Использование методики высокоразрешающего плавления ПЦР-продуктов (HRMA) является перспективным подходом к поиску наследственных мутаций в генах репарации ДНК у пациентов с клиническими признаками HNPCC и наличием микросателлитной нестабильности.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (№ 10-04-00962-а), Министерства образования и науки Российской Федерации (№ 02.740.11.0780) и Правительства Москвы (№ 15/11-Ген-М).

ЛИТЕРАТУРА

1. Егоренков В.В., Имянитов Е.Н., Правосудов И.В. и др. Клинические аспекты наследственного неполипозного рака толстой кишки: опыт проведения генетического консультирования // Вопросы онкологии. 2008. Т. 54, № 2. С. 178–182.
2. Мерабишвили В.М. Злокачественные новообразования в мире, России, Санкт-Петербурге. СПб.: Коста, 2007. 290 с.
3. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2007 году (заболеваемость и смертность). М.: ФГУ МНИОИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий, 2009. 68 с.
4. Barak F, Milgrom R., Laitman Y. et al. The rate of the predominant Jewish mutations in the BRCA1, BRCA2, MSH2 and MSH6 genes in unselected Jewish endometrial cancer patients // Gynecol. Oncol. 2010. Vol. 119. P. 511–515.
5. Boland C.R., Thibodeau S.N., Hamilton S.R. et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer // Cancer Res. 1998. Vol. 15. P. 5248–5257.
6. Bouzourene H., Hutter P., Losi L. et al. Selection of patients with germline MLH1 mutated Lynch syndrome by determination of MLH1 methylation and BRAF mutation // Fam. Cancer. 2010. Vol. 9. P. 167–172.
7. Buhard O., Cattaneo F., Wong Y.F. et al. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors // J. Clin. Oncol. 2006. Vol. 24. P. 241–251.
8. Gryfe R., Kim H., Hsieh E.T. et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer // N. Eng. J. Med. 2000. Vol. 342. P. 69–77.
9. Guillem J.G., Moore H.G., Palmer C. et al. A636P testing in Ashkenazi Jews // Fam. Cancer. 2004. Vol. 3. P. 223–227.
10. Fallik D., Borrini F., Boige Y. et al. Microsatellite instability is a predictive factor of the tumor response to irinotecan in patients with advanced colorectal cancer // Cancer Res. 2003. Vol. 63. P. 5738–5744.
11. Lynch H.T., Boland C.R., Gong G. et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity in Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications // Eur. J. Hum. Genet. 2006. Vol. 16. P. 390–402.
12. Loukola A., Eklin K., Laiho P. et al. Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) // Cancer Res. 2001. Vol. 61. P. 4545–4549.
13. Mukherjee B., Rennert G., Ahn J. et al. High risk of colorectal and endometrial cancer in Ashkenazi families with the MSH2 A636P founder mutation // Gastroenterology. 2011. Vol. 140. P. 1919–1926.
14. Muller A., Edmontson T.B., Dietmaer W. et al. MSI-testing in hereditary non-polyposis colorectal carcinoma (HNPCC) // Dis. Markers. 2004. Vol. 20. P. 225–236.
15. Ollila S., Dermadi Bebek D., Jiricny J., Nystrom M. Mechanisms of pathogenicity in human MSH2 missense mutants // Hum. Mutat. 2008. Vol. 29. P. 1355–1363.
16. Peltomäki P., Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition. Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database // Dis. Markers. 2004. Vol. 20. P. 269–276.
17. Rahner N., Streinke V., Schelgelberer B. et al. Clinical utility gene card for: Lynch syndrome (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) // Eur. J. Hum. Genet. 2010. Vol. 18, doi: 10.1038/ejhg. 2009. 232
18. Sokolenko A.P., Rozanov M.E., Mittushkina N.V. et al. Founder mutations in early-onset, familial and bilateral breast cancer patients from Russia // Fam. Cancer. 2007. Vol. 6. P. 281–286.
19. Strate L.L., Syngal S. Hereditary colorectal cancer syndromes // Cancer Causes Control. 2005. Vol. 16. P. 201–213.
20. Sun S., Grenwood C.M., Thiffault J. et al. The HNPCC associated MSH2*1906 G->C founder mutation probably originated between 1440 CE and 1715 CE in Ashkenazi Jewish population // J. Med. Genet. 2005. Vol. 42. P. 766–768.
21. Suspitsin E.N., Sherina N.Y., Ponomariova D.N. et al. High frequency of BRCA1, but not CHEK2 or NBS1(NBN) founder mutations in Russian ovarian cancer patients // Hered. Cancer Clin. Pract. 2009. Vol. 25. P. 5.

22. Takahashi M., Shimodaira H., Andreutti-Zaugg C. et al. Functional analysis of human MLH1 variants using yeast and vitro mismatch repair assays // *Cancer Res.* 2007. Vol. 67. P. 4595–4604.

23. Umar A., Boland C.R., Terdiman J.P. et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability // *J. Natl. Cancer Inst.* 2004. Vol. 96. P. 261–268.

24. Vasen H.F., Boland C.R. Progress in genetic testing, classification, and identification of Lynch syndrome // *JAMA.* 2005. Vol. 293. P. 2028–2030.

25. Wijnen J.T., Vasen H.F., Khan P.M. et al. Clinical findings with implications for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer // *N. Engl. J. Med.* 1998. Vol. 339. P. 511–518.

26. Zigelboim I., Powell M.A., Babb S.A. et al. Epitope-positive truncating MLH1 mutation and loss of PMS2: implications for IHC-directed genetic testing for Lynch syndrome // *Fam. Cancer.* 2009. Vol. 8. P. 501–504.

Поступила 17.10.12