

На правах рукописи

Янус Григорий Аркадьевич

**МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
НАСЛЕДСТВЕННОГО РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ**

Специальность: 14.01.12 – онкология

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург

2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации и Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Евгений Наумович Имянитов - чл-корр. РАН, профессор

Официальные оппоненты:

Сергей Владимирович Орлов - чл-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии».

Михаил Михайлович Шавловский - доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории молекулярной генетики человека ФГБНУ «ИЭМ», профессор кафедры медицинской генетики ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России.

Ведущее научное учреждение:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «03» октября 2017 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета при ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (197758, г. Санкт-Петербург, Песочный-2, ул. Ленинградская, д.68).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России по адресу: 197758, г. Санкт-Петербург, Песочный-2, ул. Ленинградская, д.68,

на сайте <http://www.niioncologii.ru/science/thesis>

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

д.м.н.

Филатова Лариса Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Рак толстой кишки (РТК) находится на третьем месте среди наиболее распространенных онкологических заболеваний как в России, так и в мире (Каприн и др., 2016; Ferlay et al., 2013). В структуре заболеваемости колоректальным раком до 5% случаев приходится на моногенные наследственные опухолевые синдромы. Во всех исследованных популяциях к числу наиболее частых форм наследственного рака относятся два доминантных наследственных заболевания - синдром Линча (наследственный неполипозный рак толстой кишки) и семейный аденоматозный полипоз (САП), а также рецессивный MUTYH-ассоциированный полипоз (МАП).

Хотя данные наследственные опухолевые синдромы составляют небольшую долю всего РТК, их выявление имеет большое практическое значение. Действительно, существуют отличия между оптимальной тактикой ведения некоторых пациентов с наследственным РТК и стандартным лечением sporadических опухолей толстой кишки. К примеру, у молодых больных РТК с синдромом Линча рекомендуется расширение объема оперативного вмешательства до колэктомии, так как в течение жизни очень велик риск развития метакронного рака толстой кишки (Syngal et al., 2015). Для РТК в контексте синдрома Линча характерен феномен «микросателлитной нестабильности» (microsatellite instability, MSI), связанный с наследственными дефектами системы репарации неспаренных оснований ДНК. Данный феномен ассоциирован с хорошим прогнозом и резистентностью к 5-фторурацилу. Хотя этот вопрос все еще остается дискуссионным, сведения о наличии MSI могут повлечь отказ от адьювантной терапии у больных РТК II стадии и отказ от монотерапии 5-фторурацилом (Webber et al., 2015; Tougeron et al., 2016; Haraldsdottir et al., 2016; Sinicrope et al., 2011; Kawakami et al., 2015). В последнее время большое внимание уделяется иммунотерапии опухолей: в рамках синдрома Линча и МАП возникают гипермутабельные, потенциально иммуногенные опухоли (Llosa et al., 2015; Al-Tassan et al., 2002; Rashid et al., 2016; Colebatch et al., 2006; Nielsen et al., 2009; de Miranda et al., 2009; Nielsen et al., 2010). Клиническое испытание пембролизумаба (анти-PD1 антитела) на группе опухолей с микросателлитной нестабильностью оказалось очень успешным (Le et al., 2015).

Большое значение имеет предупреждение развития РТК у клинически здоровых носителей патогенных мутаций. Существуют детальные рекомендации по организации скрининга в этих группах высочайшего онкологического риска (Syngal et al., 2015). Такие состояния требуют очень частого проведения колоноскопии, ежегодного или 1 раз в 2 года. В случае аденоматозного полипоза удаление сотен полипов, находящихся на различных этапах пути к озлокачествлению, обычно оказывается невозможным технически, и тогда больным рекомендуется коло- или колпроктэктомия (Syngal et al., 2015). Наследственные формы РТК ассоциированы и с повышением риска иных злокачественных новообразований, например, рака тела матки при синдроме Линча. Этот факт также должен учитываться при планировании скрининга. Наконец, наследственные опухолевые синдромы представляют собой естественные модели различных путей канцерогенеза при развитии sporadического РТК (Walcott et al., 2016). Их всестороннее изучение вызывает значительный интерес с позиций фундаментальной и прикладной науки.

И для клинических, и для исследовательских задач абсолютно необходимым предварительным этапом является молекулярно-генетическая диагностика наследственного рака толстой кишки. Первоначально проводится селекция больных по различным клиническим и морфологическим критериям, например, наличие полипоза, возрасту, семейной истории, характерной морфологии новообразований и т.д. (Win et al., 2013).

Для синдрома Линча отбор больных базируется не только на клинико-патологических, но и на молекулярных критериях: для скрининга используется выявление центрального для патогенеза данного заболевания явления, MSI. Часто применяется также иммуногистохимическое (ИГХ) определение белковой экспрессии генов, ассоциированных с синдромом Линча (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2). Иногда выявленные случаи тестируют на наличие мутаций в гене BRAF, не встречающихся при наследственном РТК, или на предмет гиперметилирования промотора MLH1 (Laghi et al., 2008; Poynter et al., 2011). Эти вопросы разрабатываются множеством исследовательских групп на протяжении уже 25 лет.

В то же время, оценке применения молекулярных критериев при отборе больных на диагностику MUTYH-ассоциированного полипоза посвящено всего 2-3 работы (Aime et al., 2015, Vuisine et al., 2013, Puijtenbroek et al., 2008). MUTYH является геном эксцизионной репарации оснований ДНК, и опухоли, возникающие в результате нарушения этой системы, отличаются своеобразным спектром молекулярных дефектов - как правило, повышенной частотой замен G:C>T:A. В частности, из множества возможных мутаций в онкогене KRAS в случае MUTYH-ассоциированного полипоза встречается лишь замена p.G12C (с.34G>T). Эта мутация наблюдается всего в 2-4% случаев спорадического РТК, однако её частота в MUTYH-ассоциированных карциномах достигает 60% (Aime et al., 2015). Так как статус гена KRAS – значимый предиктивный маркер, его тестирование проводится большей части пациентов с РТК. Подобный критерий селекции больных на MUTYH-диагностику, независимый от переменчивой клинической картины синдрома, представляется очень перспективным.

После отбора больных на молекулярно-генетическое исследование ассоциированных с предполагаемым диагнозом генов, существует возможность оптимизировать диагностический алгоритм при наличии в этих генах повторяющихся мутаций. Мутации могут повторяться в силу наличия в последовательности гена «горячих точек мутагенеза» и/или вследствие популяционно-генетических причин, т.н. «эффекта основателя» (“founder”-эффект). Действительно, нередка ситуация, когда существенная доля случаев заболевания в популяции связана с одной или несколькими повторяющимися мутациями (Ponti et al., 2015; Gonzales et al., 2005; Nyström-Lahti et al., 1995; Goldberg et al., 2014; Aretz et al., 2014). В таких случаях целесообразно предварительно проверить наличие этих популяционно-специфичных повреждений, и лишь при отрицательном результате перейти к анализу полной кодирующей последовательности гена.

Молекулярно-эпидемиологическим особенностям синдрома Линча, САП и МАП в России до настоящего исследования было посвящено лишь небольшое количество работ (Maliaka et al., 1996; Музаффарова, 2005; Поспехова et al., 2014; Коротаяева et al., 2011). Очевидно, для нашей популяции молекулярная эпидемиология всех трех состояний - актуальный и недостаточно изученный научный и практический вопрос.

Цели и задачи исследования

Целью настоящего исследования являлось совершенствование алгоритма молекулярно-генетической диагностики трех основных форм наследственного рака толстой кишки: синдрома Линча, семейного аденоматозного полипоза и MUTYH-ассоциированного полипоза.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1) провести поиск мутаций в генах MLH1, MSH2 и MSH6 в группе больных с выраженными признаками синдрома Линча;

- 2) оценить встречаемость повторяющихся мутаций в генах системы репарации неспаренных оснований ДНК в расширенной группе опухолей с выявленным феноменом микросателлитной нестабильности;
- 3) проанализировать спектр мутаций в генах MLH1, MSH2 и MSH6 среди российских больных синдромом Линча и сформировать оптимальный алгоритм молекулярно-генетического исследования для диагностики синдрома, учитывая наличие повторяющихся мутаций;
- 4) провести поиск мутаций в гене APC в когорте больных с клиническими признаками полипоза толстой кишки, проанализировать спектр мутаций среди российских больных семейным аденоматозным полипозом и сформировать оптимальный алгоритм молекулярно-генетического исследования для диагностики заболевания, учитывая наличие повторяющихся мутаций;
- 5) провести поиск мутаций в гене MUTYH в группе больных с клиническими признаками полипоза толстой кишки без мутаций в гене APC;
- 6) оценить возможность отбора больных РТК на диагностику MUTYH-ассоциированного полипоза по молекулярному критерию - наличие в РТК соматической мутации p.G12C в гене KRAS;
- 7) проанализировать спектр мутаций в гене MUTYH среди российских больных MUTYH-ассоциированным полипозом и сформировать оптимальный алгоритм молекулярно-генетического исследования для диагностики заболевания, учитывая наличие повторяющихся мутаций;
- 8) оценить частоту MUTYH-ассоциированного полипоза в России, исходя из популяционной частоты повторяющихся патогенных аллелей.

Научная новизна полученных данных

Проведено детальное исследование молекулярной эпидемиологии малоизученных в нашей популяции наследственных синдромов - трех форм наследственного рака толстой кишки. Впервые установлен повторяющийся характер мутации p.R245H в гене MUTYH в российской популяции. Впервые проведена оценка частоты MUTYH-ассоциированного полипоза в России. Впервые выявлен повторяющийся характер мутации p.R226L в гене MLH1 и мутации p.R621X в гене MSH2 среди больных синдромом Линча в российской популяции.

Практическая значимость полученных результатов

С учетом молекулярно-эпидемиологических данных о наличии в российской популяции повторяющихся мутаций, сформулирована оптимальная стратегия ступенчатого тестирования причинно-значимых генов для трех наиболее частых форм наследственного рака толстой кишки.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Мутация p.R226L в гене MLH1 имеет повторяющийся характер в российской популяции и встречается в 9-13% случаев синдрома Линча.
2. На два повторяющихся повреждения в гене APC, p.Q1062fs* и p.E1309Dfs*4, приходится 30% случаев семейного аденоматозного полипоза. Анализ гена APC целесообразно начинать с тестирования этих мутаций.
3. Наличие соматической мутации p.G12C в гене KRAS при РТК может служить основанием к тестированию больного на наличие наследственных мутаций в гене

MUTYH, так как в этой группе пациентов биаллельные дефекты MUTYH встречаются с частотой 7%.

4. Впервые обнаружен повторяющийся характер мутации p. R245H в гене MUTYH в российской популяции, причем вклад этой мутации в заболеваемость MUTYH-ассоциированным полипозом сопоставим с вкладом известной европейской “founder”-мутации p.Y179C. При проведении молекулярно-генетического анализа для выявления наследственных мутаций в гене MUTYH целесообразно внедрение предварительного тестирования не только на повторяющиеся мутации p.Y179C и p.G396D, но и на p. R245H.
5. Расчетная популяционная частота MUTYH-ассоциированного полипоза, связанного с тремя повторяющимися в России мутациями, составила 1:22957, что приблизительно в 1,5-3 раза меньше, чем аналогичные показатели для европейских популяций (1:7695-1:15625).

Апробация работы

Результаты работы были представлены на II Петербургском онкологическом форуме «Белые Ночи – 2016» (22–24 июня 2016 г., Санкт-Петербург).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 3 - в журналах, включенных в перечень ведущих периодических изданий ВАК, а также 5 – в зарубежных изданиях, текущие номера которых входят в международные реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science, Scopus, PubMed, Springer.

Личный вклад автора в исследование

Автор лично проанализировал литературу по теме диссертации и написал обзор литературы, отобрал или выделил заново из биологического материала образцы ДНК, вошедшие в исследование, провел необходимые молекулярно-генетические исследования и проанализировал их результаты. Самостоятельно написал текст диссертации.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 239 страницах и состоит из введения, глав обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения полученных данных и заключения. Работа иллюстрирована 7 рисунками и 16 таблицами. Библиографический указатель включает 758 источников, в том числе 7 отечественных и 751 зарубежный.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

План работы и общее описание дизайна исследования

I. В рамках исследования синдрома Линча планировалось:

- 1) осуществить поиск мутаций в кодирующей последовательности генов MLH1, MSH2, MSH6 в группе пациентов с клиническими (семейный анамнез, раннее начало заболевания, первично-множественные опухоли) и молекулярными (микросателлитная нестабильность) признаками синдрома Линча;

2) при выявлении в российской популяции повторяющихся мутаций определить их частоту в независимой выборке опухолей с выраженной микросателлитной нестабильностью (microsatellite instability - high, MSI-H);

3) установить на выборке MSI-H опухолей частоту мутаций, характерных для евреев-ашкенази (р.А636Р в гене MSH2), для польской (р.А681Т в гене MLH1, с.942+3А>Т) и финской (делеция 16 экзона гена MLH1) популяций.

II. В рамках исследования семейного аденоматозного полипоза планировалось:

1) осуществить поиск мутаций в кодирующей последовательности гена APC в группе больных, страдающих полипозом толстой кишки;

2) определить частоту перестроек, затрагивающих ген APC, с помощью метода MLPA.

III. В рамках исследования MUTYH-ассоциированного полипоза толстой кишки планировалось:

1) осуществить поиск мутаций во всей кодирующей последовательности гена MUTYH в группе больных полипозом толстой кишки, у которых не было выявлено патогенных мутаций в гене APC;

2) осуществить поиск европейских повторяющихся мутаций (р.Y179C и р.G396D) в группе больных РТК с соматической мутацией р.G12C в гене KRAS;

3) провести анализ кодирующей последовательности гена MUTYH в образцах, полученных от гетерозиготных носителей повторяющихся мутаций;

4) осуществить поиск всех выявленных нами мутаций в гене MUTYH, помимо р.Y179C и р.G396D, в группе больных РТК с соматической мутацией р.G12C в гене KRAS;

5) определить частоту всех выявленных нами повторяющихся мутаций на выборке «последовательных» случаев рака толстой кишки;

6) определить популяционную частоту всех выявленных нами повторяющихся мутаций на крупной выборке здоровых доноров.

Материалы

Синдром Линча

В первую часть исследования молекулярной эпидемиологии синдрома Линча вошли 4 больных, проходивших лечение в НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова в 2012-2016 годах, с выраженными клиническими признаками наследственного рака. В ходе рутинного исследования в опухолях этих больных была выявлена микросателлитная нестабильность. Клинические характеристики больных сведены в таблицу 1. ДНК была выделена из крови пациентов.

Таблица 1. Клинические характеристики больных с подозрением на синдром Линча

№	Возраст	Пол	Диагноз	Семейный анамнез
Fu 4279	47	М	Рак слепой кишки	Сестра – РТК (28 лет), Отец – РТК (51 лет), Дед (о) – РТК (60 лет) <i>Подпадает под Амстердамские критерии</i>
Fu 3818	14	М	Рак толстой кишки, мультиформная глиобластома	Неизвестен
Fu 4554	53	Ж	Рак толстой кишки	Сестра – рак яичников (45 лет), отец – РТК (50 лет), Дядя (о) – РТК (40 лет), Племянник (о, д) – РТК (40 лет), Тетя (о) – РТК (30 лет), Племянник (о, т) – РТК (51 год), бабушка (о) – РТК, рак молочной железы, рак яичников (умерла в 50)

				лет) <i>Подпадает под Амстердамские критерии</i>
Fu 7460	29	М	Рак печеночного изгиба ободочной кишки	Отец – РТК (65 лет), дядя (м) – рак гортани, дед (м) – рак желудка

Во вторую фазу исследования молекулярной эпидемиологии синдрома Линча вошли 42 образца MSI-H новообразований, направленных в лабораторию молекулярной онкологии НИИ онкологии им Н.Н. Петрова с целью рутинной диагностики феномена микросателлитной нестабильности за период 2006-2014 гг. 36 новообразований являлись РТК, 1 – раком тонкой кишки, 5 – раком тела матки. Средний возраст больных составил 47 (19-73) лет. Среди больных РТК мужчины составляли 23/37 (62%) когорты. ДНК для молекулярно-генетического исследования была выделена из архивных патоморфологических срезов. От 2 больных на исследование поступила венозная кровь.

Семейный аденоматозный полипоз

В исследование вошло 30 пациентов, страдающих полипозом толстой кишки и проходивших лечение в НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова с 2013 по 2016 год. Средний возраст больных составил 38,3 (18-64) года. У 15/30 (50%) наблюдался рак толстой кишки. Первично-множественные образования были выявлены при этом у 3/14 (21%) больных РТК. У одной пациентки в детстве (12 лет) была проведена колопроктэктомия в связи с необычайно выраженным полипозом, а у ее дочери была выявлена десмоидная опухоль брюшной стенки (12 лет). Семейная история полипоза, РТК или ассоциированных новообразований наблюдалась у 9/30 (30%) пациентов. ДНК для исследования была выделена из крови пациентов.

MUTYH-ассоциированный полипоз

В исследование молекулярной эпидемиологии и алгоритмов молекулярно-генетической диагностики МАП входили 3 группы больных. Первая группа – больные, протестированные в рамках нашего исследования на мутации в гене APC, у которых мутаций в этом гене выявлено не было. В этой группе насчитывалось 10 больных. Средний возраст больных составил 39,3 (23-61) года. РТК наблюдался у 4/10 (40%) больных. Семейная история – у 1 из 10 (10%) пациентов.

Во вторую группу вошли больные РТК, чей опухолевый материал был направлен на исследование статуса онкогена KRAS, и у кого была выявлена мутация p.G12C. Большинство присланных на исследование опухолей – метастатические карциномы, так как предиктивная значимость мутаций в гене KRAS показана лишь для IV стадии РТК. Этим больным в рамках рутинной диагностики автором (2008-2015) и его коллегами (2015-2016) проводилось генетическое тестирование на наличие соматических мутаций в данном гене по методикам, опубликованным ранее. Общее число образцов с мутациями в гене KRAS составило 1517/3335 (45,4%). Образцы с мутацией p.G12C составили 116/3335 (3,5%) образцов. Из них доступных для анализа было 91/116 (78,1%). Средний возраст больных составил 58,4 года (30-80 лет).

В исследование также вошла группа «последовательных» случаев РТК. В данную выборку были включены образцы ДНК от 167 больных, проходивших лечение в НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова в период 2005-2006 года. Характеристики этой когорты были опубликованы нами ранее, однако часть образцов стала недоступна для молекулярно-генетического исследования в силу малого количества ДНК и была исключена из исследования (28/195, 14%). Средний возраст больных в оставшейся части когорты

составил 63,4 года. Женщины составили 91/167 (54%) этой группы. В когорте насчитывалось 18/167 (10,8%) случаев правосторонних раков.

Кроме того, в исследование вошли 1120 образцов ДНК здоровых доноров, имевшихся в распоряжении лаборатории молекулярной онкологии НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова.

Методы

Выделение ДНК

Выделение геномной ДНК из парафиновых срезов начиналось с депарафинизации в ксилоле на протяжении 5 минут. Затем образцы промывались 96% и 70% этанолом по 2 минуты. После удаления этанола к тканям добавлялся лизирующий буфер (10 ммоль Tris-HCl (pH=8.0), 0.1 ммоль ЭДТА; pH=8.0, 2% натрия додецилсульфат) и протеиназа К (20 мг/мл). Инкубация образцов проводилась при t=60°C 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 встряхивания пробирки в течение 10 минут пробы центрифугировались при 15000g в течение 20 минут. Супернатант отбирался в чистые пробирки с 0,1 объема 3М ацетата Na (pH=4.0), 0,3 объема хлороформа. После встряхивания образцы центрифугировались. К супернатанту добавлялся раствор гликогена (20 мг/мл) и 1 объем холодного изопропанола. Пробы оставлялись не менее чем на 3 часа при -20°C. Затем пробирки центрифугировались при 15000g в течение 30 минут. Полученный осадок однократно промывался в 70% этаноле в течение 10 минут. Далее осадок подсушивался при 40°C, а затем растворялся в 30 мкл стерильной воды при 65°C. Раствор ДНК хранился при -20°C.

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови проводили посредством модифицированного соль-хлороформного метода (Mullenbach et al., 1989). Кровь собирали в пробирки, содержащие 0,5 М раствор ЭДТА. Гипоосмотический лизис эритроцитов достигался посредством 3-кратного разведения 5 мл крови дистиллированной водой, охлажденной до 44° С. Затем лейкоциты осаждали центрифугированием. Полученный осадок ресуспендировали в 1 мл раствора Трис-HCl (pH = 8,3), 1 mM ЭДТА. Для разрушения цитоплазматических мембран клеток добавляли Тритон X - 100 до конечной концентрации 1%. Ядра осаждали центрифугированием. Осадок вновь ресуспендировали в 1 мл Трис - HCl (pH = 8,3) и лизировали посредством добавления лаурилсульфата натрия до конечной концентрации 1%. Проба инкубировалась в присутствии протеиназы К (200 мкг/мл) при 60° С в течение 12 часов. Затем к лизату добавляли раствор хлорида натрия до конечной концентрации 1,5 М и равный объем хлороформа. Экстракцию проводили в течение 30 минут и проводили центрифугирование. Для осаждения ДНК к отобранному супернатанту добавляли два объема 96% этанола и оставляли на 20 минут при температуре - 20 °С. Осадок собирали центрифугированием в течение 5 минут при 12000 g. Отмывание осадка производили в 1 мл 70% этанола и затем, после центрифугирования, растворяли в 0,5 мл 200 mM раствора ТрисЭДТА (pH = 7,6). Раствор ДНК хранился при -20°C.

Детекция микросателлитной нестабильности

Феномен MSI детектировался с использованием квазимономорфного мононуклеотидного маркера BAT26. Последовательность праймеров: 5'-TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3' и ААССАТТСААСАТТТТТААССС-3'. ПЦР проводилась в конечном объеме 20 мкл. Каждая реакция содержала 1 мкл раствора ДНК, 0,5 ед. ДНК-полимеразы, 1X ПЦР-буфер (pH 8.3), 2,5 mM MgCl₂, 200 мкМ каждого из

четырёх нуклеотидтрифосфатов, 0,3 мкМ прямого и обратного праймеров. Использовались следующие условия реакции: стартовая активация Taq-полимеразы при 95⁰С – 10 минут; 45 циклов амплификации (денатурация: 15 сек при 95⁰С; отжиг: 30 сек при 60⁰С; элонгация 30 сек при 72⁰С). Размер полученного продукта – 226 н.п. Полученный продукт разделяли методом электрофореза в 10% полиакриламидном геле. Позитивным считался образец, демонстрирующий изменение длины микросателлитной последовательности.

Детекция мутаций в генах MLH1, MSH2, MSH6

Детекция мутаций в генах MLH1, MSH2, MSH6 проводилась при помощи высокоточного анализа кинетики плавления продуктов амплификации (high-resolution melting analysis, HRM). ПЦР проводилась в конечном объеме 20 мкл. Каждая реакция содержала 1 мкл раствора ДНК, 0,5 ед. ДНК-полимеразы, 1X ПЦР-буфер (рН 8,3), 2,5 мМ MgCl₂, 200 мкМ каждого из четырех нуклеотидтрифосфатов, 0,3 мкМ прямого и обратного праймеров, 1X краситель Eva Green. Условия реакции не отличались от описанных выше для детекции феномена MSI. Продукт ПЦР подвергался HRM. Оценка формы кривой плавления проводилась при помощи программного обеспечения (Precision Melting Analysis) прибора CFX96 (Bio-Rad, USA). Здесь и далее: последовательности всех праймеров были подобраны с помощью Интернет-ресурса www.ensembl.org и программы Gene Runner, если не указано иное. Продукты, показавшие аномальный характер плавления, подвергались секвенированию.

Секвенирование проводилось с помощью набора GenomeLab DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, USA) согласно рекомендациям производителя. Продукт реакции секвенирования подвергался капиллярному электрофорезу в системе генетического анализа CEQ 8000 (Beckman Coulter, USA).

Детекция внутригенных хромосомных перестроек в генах MLH1 и MSH2 проводилась при помощи MLPA. Использовался коммерческий набор P003 лот C1-0114 (MRC-Holland, Нидерланды), направленный на детекцию подобных aberrаций. Генотипирование проводилось по протоколам производителя.

Детекция мутации p.R226L в гене MSH2 осуществлялась при помощи аллель-дискриминирующего теста, основанного на применении зонда TaqMan. ПЦР проводилась подобно описанному выше протоколу, однако вместо красителя содержала 0,3 мкМ гибрида зонда к аллелю дикого типа и мутантному аллелю. ПЦР проводилась с помощью прибора CFX96 (Bio-Rad, USA). Выявление мутаций осуществлялось путем сравнения уровня нарастания флюоресценции при проведении амплификации в реальном времени, отраженного в кривых флюоресценции, соответствующих амплификации аллеля дикого типа и мутантного аллеля.

Детекция «финской» мутации - делеции 16 экзона гена MLH1 проводилась методом аллель-специфической ПЦР. Праймеры и условия реакции взяты из финской работы (Nystrom-Lahti et al., 1995). Выявление мутации p.A681T в гене MLH1, с.942+3A>T и p.A636P в гене MSH2 проводилось с помощью HRM продуктов амплификации соответствующих участков 18 экзона гена MLH1, сплайс-сайта 5 интрона и 12 экзона гена MSH2. Образцы, показавшие отклонения в кривых плавления, подвергались секвенированию.

Детекция мутаций в гене APC

Детекция мутаций в гене APC проводилась при помощи HRM-анализа продуктов амплификации. Условия ПЦР не отличались от указанных выше. Продукты, показавшие аномальный характер плавления, подвергались секвенированию.

Детекция хромосомных перестроек, затрагивающих ген APC, проводилась при помощи MLPA. Использовался набор P043 лот D1-0513 (MRC-Holland, Нидерланды). Генотипирование проводилось по протоколам производителя.

Детекция мутаций в гене MUTYH

Детекция мутаций в гене MUTYH проводилась с помощью HRM-анализа продуктов амплификации. Последовательности всех праймеров, кроме праймеров для амплификации 8 и 16 экзона (López-Villar et al., 2010), были подобраны самостоятельно. Продукты, показавшие аномальный характер плавления, подвергались секвенированию. Экзоны 3, 4, 7, 10, 13 подверглись прямому секвенированию. Амплификация проводилась с использованием красителя SYBR Green.

Детекция мутаций p. L111P, p.Y179C, p.P295L и p. Q416X осуществлялась путем аллель-специфической ПЦР. Последовательности всех праймеров, кроме направленных на детекцию мутации p.Y179C (Lubbe et al., 2009), были подобраны самостоятельно. Условия ПЦР отличались от указанных выше тем, что вместо красителя Eva Green использовался 0.2X краситель SYBR Green. Аллель-специфическая ПЦР проводилась с помощью прибора CFX96 (Bio-Rad, USA). Выявление мутаций осуществлялось путем сравнения пороговых циклов нарастания флюоресценции.

Мутация Q293X детектировалась путем проведения HRM-анализа продуктов амплификации экзона 10 и секвенирования аномальных по плавлению продуктов.

Детекция мутаций p.R245H и p.G396D осуществлялась при помощи аллель-дискриминирующего теста, основанного на применении зонда TaqMan, аналогичного описанному выше – для детекции мутации p.R226L в гене MLH1.

Статистический анализ данных

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения SPSS. Различия считались значимыми при $p < 0.05$. Двухсторонний непараметрический тест Манна-Уитни (Mann-Whitney U test) использовался для сравнения возраста в разных группах. Сравнение частот различных аллелей, гендерного состава в разных группах проводилось при помощи критерия Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Синдром Линча

Поиск мутаций в генах системы MMR среди больных с клиническими и молекулярными признаками синдрома Линча

Нами были прогенотипированы 4 случая MSI-H РТК с признаками синдрома Линча. Проанализировав кодирующую последовательность генов системы репарации неспаренных оснований MLH1, MSH2, MSH6 при помощи HRM и секвенирования, мы выявили герминальные мутации в гене MLH1 у трех пациентов: p.R226L, p.I637Lfs*6 и p.A681T. Применение MLPA не обнаружило крупных перестроек MLH1 и MSH2 в случае, негативном по результатам HRM-анализа, а также в случае с подозрением на наличие синдрома Тюрко. Клинико-генетические данные по этим пациентам сведены в таблицу 2. Характеристики двух из трех носителей мутаций укладывались в Амстердамские критерии. Третий случай, № Fu3818, отличался исключительно ранним началом заболевания (14 лет), а также сочетанием РТК и мультиформной глиобластомы, свойственным синдрому Тюрко. Тем не менее, других мутаций в гене MLH1 у данного

больного выявлено не было. Больной, у которого мутации в генах системы MMR обнаружены не были, также отличался крайне молодым возрастом на момент диагноза (29 лет), но персональный и семейный онкологический анамнез этого пациента не был столь ярким, как у других больных.

Одна из обнаруженных мутаций, MLH1 p.R226L, уже была описана в российской популяции ранее, что послужило поводом для изучения ее частоты в расширенной выборке MSI-H опухолей.

Определение частоты мутации MLH1 p.R226L, «польских», «ашкеназской» и «финской» “founder”-мутаций в выборке опухолей с молекулярными признаками синдрома Линча (MSI-H)

Генотипирование выборки из 42 MSI-H опухолей толстой кишки и эндометрия на наличие мутации p.R226L привело к выявлению еще одного случая носительства данного аллеля у больного РТК.

Связаться с больным для установления наследственного характера мутации не удалось, однако соматический характер выявленного нами повреждения маловероятен. Эта замена не встречается в базе данных соматических мутаций при раке COSMIC (Forbes et al., 2014; Cosmic v78). Вместе с тем, наследственная мутация p.R226L не только ранее выявлялась нами, но и упоминается в ряде работ иных авторов (Wagner et al., 2003; Kurzhawski et al., 2002; Kurzhawski et al., 2006). Молодой возраст больного и, что важнее, первично-множественный характер новообразования также говорят в пользу наследственного характера повреждения гена MLH1.

К сожалению, часть MSI-H образцов не были протестированы по всем избранным позициям в силу малого количества и низкого качества ДНК, выделенной из архивного опухолевого материала. Тем не менее, в исследованной выборке нами не было выявлено ни одного случая «финской» делеции 16 экзона гена MLH1 (0/39), «польских» замен p.A681T в гене MLH1 (0/41) и c.942+3A>T в гене MSH2 (0/34) и «ашкеназской» замены p.A636P в гене MSH2 (0/35). В ходе тестирования выборки на наличие «ашкеназской» мутации у тридцатилетнего больного раком тонкой кишки была выявлена мутация p.R621X в гене MSH2. С больным удалось связаться и подтвердить зародышевый характер мутации, обнаружив повреждение в образце ДНК, выделенной из крови.

Кроме того, в ходе поиска «польской» замены A681T в 18 экзоне гена MLH1 мы выявили соматическую мутацию p.L697Sfs*86_ext26 у семидесятилетней больной MSI-H РТК. Установить соматический характер данной мутации удалось благодаря наличию в нашем распоряжении образца ДНК, выделенного из крови пациентки.

Таблица 2. Клинико-генетические характеристики всех выявленных случаев синдрома Линча

№	Возраст	Пол	Диагноз	Семейный анамнез	Выявленные мутации
Fu 4279	47	М	Рак слепой кишки	Сестра – РТК (28 лет), Отец – РТК (51 лет), Дед (о) – РТК (60 лет) <i>Подпадает под Амстердамские критерии</i>	MLH1: p.A681T (c.2041G>A)
Fu 3818	14	М	Рак толстой кишки, мультиформная глиобластома	Неизвестен.	MLH1: p.I637Lfs*6 (c.1909delA)
Fu 4554	53	Ж	Рак толстой кишки	Сестра – рак яичников (45 лет), отец – РТК (50 лет), Дядя (о) – РТК (40 лет), Племянник (о, д) – РТК (40 лет), Тетя (о) – РТК (30 лет), Племянник (о, т) – РТК (51 год), бабушка	MLH1: p.R226L (c.677G>T)

				(о) – РТК, рак молочной железы, рак яичников (умерла в 50 лет) <i>Подпадает под Амстердамские критерии</i>	
Fu 9411	42	М	Первично-множественный РТК	Неизвестно	MLH1: p.R226L (c.677G>T)
Fu 6719	30	М	Рак тонкой кишки	Бабушка (о) – РТК Дядя (о) – рак желудка (40 лет)	MSH2: p.R621X (c.2084C>T)

Семейный аденоматозный полипоз

Генотипирование кодирующей последовательности гена APC у 30 больных с клинической картиной полипоза толстой кишки привело к выявлению 20/30 (66%) случаев с наследственными мутациями в этом гене. Интересно, что больные с мутациями в гене APC по возрасту не отличались от пациентов без мутаций ($p=0,56$, U-критерий Манна-Уитни). Клинико-генетические характеристики больных с мутациями приведены в Таблице 3. Преобладали две делеции, находящиеся в «горячих точках мутагенеза»: c.3183_3187delACAAA (p.Q1062fs*), встретившаяся в 3/20 (15%) случаев, и c.3927_3931delAAAGA (p.E1309Dfs*4), обнаруженная у 3/20 (15%) больных. Совместно на эти два генетических повреждения приходится 6/20 (30%) случаев САП.

Один из обнаруженных генетических вариантов, p.K73Nfs*6, локализован в регионе, дефекты в котором ассоциированы с аттенуированной формой полипоза толстой кишки.

подавляющее большинство, 17/20 (85%) выявленных нами повреждений – это «транквирующие» мутации: инсерции и делеции, влекущие сдвиг рамки считывания (12/20, 60%) и нонсенс-мутации (5/20, 25%). Патогенность двух найденных мутаций, затрагивающих сайты сплайсинга (c.1312+5G>A, c.1958+1G>A), не столь очевидна. Наконец, одна из выявленных нами мутаций (1/20, 5%) представляет собой делецию всей последовательности гена APC.

Таблица 3. Клинико-генетические характеристики молекулярно подтвержденных случаев семейного аденоматозного полипоза

№	Возраст	Пол	Диагноз	Семейный анамнез	Выявленные мутации в гене APC
8013	64	ж	Полипоз, синхронный первично-множественный рак сигмовидной и поперечной ободочной кишки (печеночный изгиб), восходящей ободочной кишки и два фокуса карциномы in situ в полипах толстой кишки	Неизвестно	p.K73Nfs*6 (c.219_220insTA)
MG76	33	м	Полипоз, РТК	бабушка (о) – рак желудка, двоюродный дядя (о) - РТК	p.R232X (c.694C>T)
7531	34	ж	Аттенуированный полипоз (80-100 полипов), рак поперечной ободочной кишки	мама, дядя (м), тетья (м) -РТК; двоюродные братья и сестры – РТК (?)	p.S254Hfs*49 (c.755_756insAGGTCATC TCAGAACAAGCATGAA ACCG)
MG293	27	ж	Полипоз, рак сигмовидной кишки	Неизвестно	p.E422X (c.1264 G>T).
MG197	32	ж	Полипоз	мать – полипоз толстой кишки, дед (м) – полипоз толстой кишки, прабабушка(м, д) – полипоз толстой кишки	c.1312+5G>A
MG315	56	м	Полипоз, рак восходящей ободочной кишки	Неизвестно	c.1958+1G>A
MG356	32	м	Полипоз, рак прямой	брат – полипоз толстой кишки	p.E658Tfs*11

			кишки		(c.1972_1975delAGAG)
MG412	18	м	Полипоз	неизвестно	p.Y796Wfs*2 (c.2387_2388delAT)
MG239	55	м	Полипоз, классическая форма: >100 полипов	мать - рак двенадцатиперстной кишки (55 л)	p.Q978X (c.2932C>T)
MG407	29	ж	Полипоз, рак прямой кишки	неизвестно	p.Q1062fs* (c.3183_3187delACAAA)
7214	41	ж	Полипоз, синхронный первично-множественный рак сигмовидной и прямой кишки	тетя (м) – рак шейки матки, бабушка (м) – рак почки, прадед (б,м) - рак губы, дед (о) – рак легкого	p.Q1062fs* (c.3183_3187delACAAA)
MG153	26	м	Полипоз	Нет	p.Q1062fs* (c.3183_3187delACAAA)
6099	28	м	Полипоз	неизвестно	p.S1072Kfs*9 (c.3214insA)
MG210	52	ж	Полипоз, метахронный первично-множественный рак слепой (35 лет) и поперечной ободочной кишки (52 года)	неизвестно	p.S1189X (c.3566C>G)
MG236	49	ж	Полипоз, классическая форма: >100 полипов	дед(о) –рак прямой кишки, дочь - десмоид передней брюшной стенки (21 г)	p.E1309Dfs*4 (c.3927_3931delAAAGA)
MG238	24	м	Полипоз, РТК	дед (м) - полипоз толстой кишки (~60л), рак прямой кишки (72 г.)	p.E1309Dfs*4 (c.3927_3931delAAAGA).
8187	35	ж	Полипоз. Колпроктэктомия в 12 лет по поводу полипоза, остеомы	мать - полипоз (28 л), дед (м) – полипоз, РТК (46 л), двоюродный дед (м,д) - РТК (18 л) двоюродная бабушка (м,д) - РТК (40 л), прадед (м,д) - РТК	p.E1309Dfs*4 (c.3927_3931delAAAGA)
MG391	64	м	Полипоз	неизвестно	p.E1547Kfs*11 (c.4639_4640delGA)
5763	29	м	Полипоз	неизвестно	p.L1564X (c.4691T>G)
MG141	30	м	Полипоз, рак печеночного изгиба ободочной кишки	мать - РТК (63 г), тетя (м) - РТК (66 л)	Делеция всей последовательности гена APC

MUTYH-ассоциированный полипоз

Выявление мутаций в гене MUTYH среди больных с клиникой полипоза толстой кишки без наследственных дефектов гена APC

Генотипирование всей кодирующей последовательности гена MUTYH в группе больных с полипозом толстой кишки без мутаций в гене APC привело к выявлению 2/10 (20%) случаев биаллельной инактивации гена MUTYH: [p.R245H];[p.G396D] и [p.P295L];[p.Q416X]. Клинико-генетические характеристики носителей биаллельных повреждений MUTYH, а также пациентов с неустановленной причиной полипоза представлены в Таблице 4. При анализе клинических параметров обращает на себя внимание преобладание лиц мужского пола среди пациентов с неустановленной причиной полипоза по сравнению с группой носителей мутаций APC и MUTYH: 7/8 (88%) и 12/22 (55%). Однако эти различия не являются статистически значимыми ($p=0,2$ – критерий Фишера). У больных с биаллельной инактивацией гена MUTYH отсутствовал семейный онкологический анамнез. Злокачественное заболевание у носителей биаллельных повреждений MUTYH манифестировало рано (38 и 39 лет).

Среди выявленных генетических повреждений всего 1/4 аллелей пришлась на p.G396D, европейскую “founder”-мутацию. Необычной находкой можно считать детекцию мутации p.Q416X. В отличие от повреждений p.R245H, p.G396D и p.P295L, эта мутация до сих пор была описана всего один раз. При попытке выяснить дополнительные клинико-

генетические сведения о больной-носителнице этой мутации оказалось, что у пациентки якутское происхождение. Наконец, следует отметить, что у нас имелась возможность определить статус гена KRAS в опухолевой ткани одного из больных (MG80). В опухолевом материале пациента была обнаружена мутация KRAS p.G12C.

Таблица 4 Клинико-генетические характеристики случаев полипоза толстой кишки, не связанных с наследственными мутациями в гене APC

№	Возраст	Пол	Диагноз	Семейный анамнез	Выявленные мутации
MG234	38	ж	Полипоз, РТК	Нет	p.P295L (c.884C>T) и p.Q416X (c.1246C>T) в гене MUTYH
MG80	39	м	Полипоз, РТК	Нет	p.R245H (c.734G>A) и p.G396D (c.1145G>A) в гене MUTYH
MG209	29	м	Полипоз, рак прямой кишки	Неизвестно	Мутации не выявлены
MG270	43	м	Полипоз	отец - абдоминальный рак?	Мутации не выявлены
4945	30	м	Аттенуированный полипоз с ранним началом	отец - РТК (63г.)	Мутации не выявлены
6510	45	м	Полипоз, классическая форма (полипов более 100)	Нет	Мутации не выявлены
MG110	23	м	Полипоз	бабушка (о) -рак легкого (67 л), бабушка (м) - рак желудка (51 г)	Мутации не выявлены
MG142	61	ж	Полипоз	Неизвестно	Мутации не выявлены
MG147	40	м	Полипоз	Нет	Мутации не выявлены
MG348	45	м	Полипоз	отец - рак почки, дед (о)- рак?, тетя (о) - рак молочной железы	Мутации не выявлены

Определение частоты повторяющихся европейских мутаций p.Y179C и p.G396D в гене MUTYH среди случаев РТК с соматической мутацией p.G12C в гене KRAS

Генотипирование мутаций p.Y179C и p.G396D в выборке опухолей толстой кишки с соматической мутацией p.G12C в гене KRAS привело к выявлению трех случаев компаундных гетерозигот [p.Y179C];[p.G396D], 3/91 (3,2%), а также 3 гетерозиготных мутаций p.G396D и 1 гетерозиготной мутации p.Y179C.

Далее у гетерозиготных носителей патогенных мутаций был проведен поиск других патогенных дефектов в оставшейся части гена. К сожалению, в ряде образцов малое количество ДНК препятствовало генотипированию всей последовательности гена MUTYH. Тем не менее, удалось выявить 3 носителей биаллельных повреждений в гене MUTYH: [p.R245H];[p.G396D], [p.Q293X];[p.G396D] и [p.G396D];[p.L111P]. Клинико-генетические характеристики всех носителей биаллельных мутаций сведены в Таблицу 5.

Таблица 5 Клинико-генетические характеристики носителей биаллельных мутаций в гене MUTYH

№	Критерий селекции на диагностику	Возраст	Пол	Диагноз	Выявленные мутации
Fu6924	Мутация p.G12C в гене KRAS	59	ж	Полипоз, РТК	p.Y179C (c.536A > G) и p.G396D (c.1187 G > A)
Fu10837	Мутация p.G12C в гене KRAS	62	ж	Полипоз, РТК	p.Y179C (c.536A > G) и p.G396D (c.1187 G > A)
P1109	Мутация p.G12C в гене KRAS	48	ж	РТК (полипоз?)	p.Y179C (c.536A > G) и p.G396D (c.1187 G > A)
Fu3906	Мутация p.G12C в гене KRAS	59	м	РТК (полипоз?)	p.L111P (c.332C>T) и p.G396D (c.1187 G > A)
Fu3046	Мутация p.G12C в гене KRAS	46	ж	РТК (полипоз?)	p.R245H (c.734G>A) и p.G396D (c.1187 G > A)
P1013	Мутация p.G12C в гене	38	м	Полипоз, классическая форма	p.Q293X (c.877G>A) и

	KRAS			(полипов более 100)	p.G396D (c.1187 G > A)
MG234	Полипоз	38	ж	Полипоз, РТК	p.P295L (c.884C>T) и p.Q416X (c.1246C>T)
MG80	Полипоз	39	м	Полипоз, РТК	p.R245H (c.734G>A) и p.G396D (c.1145G>A)

Определение частоты всех выявленных мутаций в гене MUTYH среди случаев РТК с соматической мутацией p.G12C в гене KRAS

Выборка из 91 РТК с соматической мутацией KRAS p.G12C была проанализирована на наличие мутаций p. L111P, p.R245H, p.Q293X, p.P295L и p.Q416X в гене MUTYH, в результате чего был дополнительно обнаружен один случай гетерозиготного носительства мутации p.R245H. Таким образом, среди РТК, содержащих KRAS p.G12C, всего имелось 6/91 (7%) случаев MUTYH-ассоциированного полипоза.

Как и следовало ожидать, при MUTYH-ассоциированном полипозе манифестация заболевания наблюдалась позднее по сравнению с молекулярно-подтвержденным семейным аденоматозным полипозом ($p=0,0394$, U-критерий Манна-Уитни). Действительно, средний возраст больных MUTYH-ассоциированным полипозом составил 48,6 лет, а больных с семейным аденоматозным полипозом – 37,6 лет. Во всех случаях MUTYH-ассоциированный полипоз манифестировал опухолями толстой кишки, что, впрочем, связано с избранными нами критериями отбора больных. Среди выявленных по клиническим и молекулярным критериям носителей биаллельных мутаций в гене MUTYH преобладали женщины (5/8, 63%).

С молекулярно-эпидемиологической точки зрения, интерес вызывает относительно низкая доля повторяющихся европейских аллелей в нашей выборке больных: 10/16 (63%). Мутация p.G396D составила 7/16 (44%) от всех патогенных аллелей, мутация p.Y179C – 3/16 (19%), мутация p.R245H – 2/16 (13%). Повторяющийся характер последнего повреждения был неожиданной находкой.

Гетерозиготные мутации p.Y179C и p.R245H были выявлены у двух 59-летних женщин. Так как в этих случаях имевшегося материала было недостаточно, около половины последовательности гена MUTYH – экзоны 1, 2, 6, 8, 11, 12, 16 - проанализировать не удалось.

Определение частоты выявленных повторяющихся мутаций в гене MUTYH в группе «последовательных» случаев РТК

В когорте «последовательных», т.е. не отобранных по каким-либо специальным критериям, случаев РТК было проведено генотипирование мутаций p.Y179C, p.R245H и p.G396D в гене MUTYH. В данной группе мы не обнаружили случаев MUTYH-ассоциированного полипоза (0/167, 0%), однако были выявлены 2 случая гетерозиготного носительства патогенных мутаций. Носителем патогенного аллеля p.G396D был семидесятилетний больной, страдавший раком прямой кишки. В опухоли у него обнаружилась соматическая мутация p.G13D в гене KRAS, что позволяет исключить наличие MUTYH-ассоциированного полипоза. Пациентка 53 лет, также страдавшая раком прямой кишки, являлась носительницей патогенной мутации p.R245H. Соматических повреждений KRAS у данной больной не наблюдалось. К сожалению, экзоны 2-5, 8, 11, 12 и 16 гена MUTYH в этом случае не удалось проанализировать в силу технических причин. Клинико-генетическая характеристика больных с гетерозиготными мутациями в гене MUTYH приведена в Таблице 6. Средний возраст больных с моноаллельными дефектами в гене MUTYH составил 60,2 года.

Таблица 6 Клинико-генетические характеристики носителей моноаллельных мутаций в гене MUTYH

№	Критерий селекции на диагностику	Возраст	Пол	Диагноз	Выявленные мутации
5387	Мутация p.G12C в гене KRAS	59	ж	РТК	p.Y179C (c.536A > G)
7744	Мутация p.G12C в гене KRAS	59	ж	РТК	p.R245H (c.734G>A)
AB105	Последовательные случаи РТК	53	ж	РТК	p.R245H (c.734G>A)
AB203	Последовательные случаи РТК	70	м	РТК	p.G396D (c.1187 G > A)

Характеристика спектра выявленных молекулярных повреждений в РТК

Таким образом, всего в исследованных случаях РТК нами было выявлено 20 патогенных аллелей. На мутацию p. G396D пришлось 8/20 (40%) аллелей, на мутацию p.Y179C – 4/20 (20%), на мутацию p.R245H - 4/20 (20%). Аллели, выявленные единожды, в совокупности также составили пятую часть в структуре патогенных повреждений: 4/20 (20%).

Определение частоты выявленных повторяющихся мутаций в гене MUTYH в группе здоровых доноров. Сопоставление структуры мутаций в группе здоровых доноров и группах носителей генетических дефектов MUTYH

1120 здоровых доноров были протестированы на наличие мутаций p.Y179C, p.R245H, p.G396D. Гетерозиготная мутация p.Y179C была обнаружена в 2/1120 (0,2%) случаев, p.R245H - в 1/1120 (0,1%) случаев и p.G396D – в 12/1120 (1,1%). Таким образом, аллельные частоты этих повреждений составили 0,1%, 0,05% и 0,6% соответственно. Суммарно мы выявили в популяции 15/1120 (1,3%) патогенных мутаций, т.е. их аллельная частота в совокупности составила 0,67%. Исходя из уравнения Харди-Вайнберга, расчетная частота случаев синдрома, приходящихся на повторяющиеся повреждения в гене MUTYH, составляет 1:22957 человек.

Интересно, что среди здоровых доноров на мутацию p.G396D пришлось 12/15 (80%) выявленных случаев, а в группе больных MUTYH-ассоциированным полипозом – 7/16 (44%). Различие между двумя группами статистически незначимо ($p=0,07$ – критерий Фишера).

Особенно сильно различаются по встречаемости этой мутации здоровые доноры и моноаллельные носители дефектов MUTYH – больные РТК: соответственно, 12/15 (80%) и 1/4 (25%) выявленных повреждений ($p=0,0307$ – критерий Фишера).

Если суммировать все обнаруженные нами в РТК патогенные аллели, включая гетерозиготные мутации, то различие между группами здоровых и больных (12/15 (80%) и 8/20 (39%) соответственно) приобретает статистическую достоверность ($p=0,0382$ – критерий Фишера). Диаграммы, представляющие распределение патогенных аллелей у больных РТК и у здоровых носителей мутаций, см. на Рисунке 1.

Распределение мутантных аллелей MUTYH среди больных **Распределение мутантных аллелей MUTYH среди здоровых доноров**

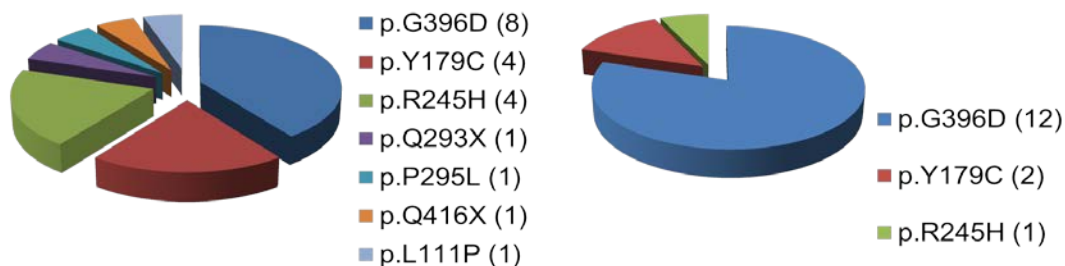


Рисунок 1 Представленность мутаций в гене MUTYH в группах больных РТК и здоровых доноров.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Синдром Линча

В настоящей работе представлены результаты исследования молекулярной эпидемиологии синдрома Линча. Выявление в структуре причинно-значимых мутаций повторяющихся повреждений имеет большое практическое значение. Имеющихся на момент планирования диссертационной работы данных было недостаточно, чтобы судить о наличии или отсутствии характерных для российской популяции генетических дефектов. До сих пор имелись сведения о детекции у российских больных синдромом Линча мутаций p.R226L и p.R659X в гене MLH1, а также p.N139fs*, p.G322D, p.L376fs, p.R621X, p.A636P и p.E878fs*3 в гене MSH2 (Maliaka et al., 1996). Ни одно из этих повреждений не было выявлено хотя бы дважды у неродственных между собой пациентов.

В настоящей работе мы постарались отобрать больных с выраженными клиническими признаками синдрома Линча, прошедших к тому же молекулярный скрининг на наличие в опухолях феномена микросателлитной нестабильности. Два пациента соответствовали чрезвычайно жестким Амстердамским критериям синдрома Линча – шанс выявить мутацию при этом составляет порядка 70-100% (Steinke et al., 2014; Katballe et al., 2002; Aaltonen et al., 1998; Salovaara et al., 2000). Действительно, в этих двух случаях были обнаружены мутации p.R226L (с.677G>T) и p.A681T (с.2041G>A) в гене MLH1.

В развитых странах наблюдается тенденция к расширению и смягчению критериев отбора на молекулярно-генетическую диагностику, что приводит к увеличению чувствительности критериев и способствует выявлению максимального количества больных. Вместе с тем, для исследовательских целей специфичность критериев важнее чувствительности. Ограничением нашего подхода может быть смещение спектра обнаруженных мутаций в сторону их локализации в более высокопенетрантных генах. При применении слишком жестких критериев отбора больных доля низкопенетрантных повреждений в структуре всех мутаций снижается. Описано, что чувствительность Амстердамских критериев в отношении мутаций в генах MSH2 и MLH1 примерно вдвое выше, чем в отношении мутаций в гене MSH6 (Ramsoekh et al., 2008). Низкопенетрантных мутаций в гене MSH6 мы не выявили ни в данной диссертационной работе, ни ранее.

Замена MLH1 p.R226L представляет собой миссенс-мутацию, поэтому ее патогенный эффект не очевиден и требует подтверждения. Однако нуклеотидная замена в данном случае затрагивает последний нуклеотид донорского сайта сплайсинга и нарушает сплайсинг, снижая функциональную активность системы MMR (Kurzawski et al., 2006; Takahashi et al., 2007). По классификации INSiGHT эта мутация относится к классу 4 вероятно патогенных повреждений (Thompson et al., 2014; INSIGHT). Впервые мутация была описана в 1996 году в молдавской семье (Maliaka et al., 1996). Она является минорным повторяющимся аллелем в Польше; в одном из крупных исследований ее частота составила 3/78 (4%) (Kurzawski et al., 2006). Она обнаружена также в Словакии (Bartosova et al., 2003). За пределами славянских популяций p.R226L выявляли в США (Wagner et al., 2003).

MLH1 p.A681T – одна из двух наиболее распространенных мутаций в Польше, на ее долю приходится 10-17% всех случаев синдрома в этой стране (Kurzawski et al., 2002; Kurzawski et al., 2006). Помимо Польши, эту мутацию регистрировали в Италии (Pedroni et al., 2007), Колумбии (Giraldo et al., 2005), Великобритании (Frogatt et al., 1996), Франции (Bonadona et al., 2011). По классификации INSiGHT эта мутация относится к классу 5 безусловно патогенных повреждений (Thompson et al., 2014, INSIGHT).

Один больной имел яркие признаки рецессивного синдрома Тюрко: в 14-летнем возрасте у него были диагностированы РТК и мультиформная глиобластома. У него, однако, была выявлена единственная мутация, p. I637Lfs*6 в гене MLH1. Эта редкая мутация была ранее обнаружена во Франции (Bonadona et al., 2011). Надо сказать, что подобные случаи неожиданно высокой экспрессивности известны (Durno et al., 2005; Amairi et al., 2016). Больной, у которого нам не удалось выявить наследственных мутаций, также был очень молод на момент диагноза, однако у него не наблюдались множественные опухоли и яркий семейный анамнез.

Существуют редкие популяции с сильно выраженным «эффектом основателя» в отношении генов системы репарации неспаренных оснований ДНК, например, финская (Nyström-Lahti et al., 1995; Aaltonen et al., 1998; Holmberg et al., 1998; Gylling et al., 2009) или популяция евреев-ашкенази (Goldberg et al., 2014). Большинство популяций столь значительного «эффекта основателя» лишены, но повторяющиеся мутации, выявляемые в 5-40% случаев синдрома, все же присутствуют. Такова, например, наиболее изученная в отношении синдрома Линча славянская популяция – польская. На мутации p.A681T в гене MLH1 и c.942+3A>T в гене MSH2 приходится 20-40% случаев (Kurzawski et al., 2002; Kurzawsky et al., 2006). Полное отсутствие повторяющихся повреждений почти невероятно, так как в генах системы MMR существуют горячие точки мутагенеза, служащие неиссякаемыми источниками определенных мутаций – такие повреждения заполняют популяционный пул патогенных аллелей повторяющимися, возникающими de novo дефектами (Desai et al., 2000; Ponti et al., 2015).

Предварительный анализ опубликованных данных свидетельствовал о том, что для нашей популяции характерны именно такие, минорные повторяющиеся повреждения. Кандидатом на роль подобной «редкой повторяющейся» мутации служит замена p. R226L в гене MLH1, так как она была выявлена дважды: в настоящей работе и ранее, у неродственной больной. Мы провели исследование на независимой выборке MSI-H новообразований и обнаружили еще одного носителя данного повреждения (1/42, 2%). Этот случай отличался выраженными признаками наследственного рака: первично-множественными опухолями и молодым возрастом манифестации болезни.

Далее мы предприняли попытку обнаружить в когорте MSI-H новообразований еще четыре «кандидатные» на роль повторяющихся мутации. В их число вошли p.A681T в гене MLH1 и c.942+3A>T в гене MSH2, характерные для Польши (наиболее изученной славянской популяции); p.A636P в гене MSH2, характерная для евреев-ашкенази (известно, что некоторые «славянские» мутации встречаются с высокой частотой среди

этой хорошо изученной этнической группы). Наконец, мы провели поиск делеции 16 экзона гена MLH1, повторяющейся финской мутации, так как Финляндия сопредельна Северо-Западному региону России. Ни одного из этих четырех повреждений мы не обнаружили, однако случайно был выявлен еще один случай синдрома Линча, связанный с наследственной мутацией p.R621X в гене MSH2. Мутация была найдена у молодого больного раком двенадцатиперстной кишки – это редкое заболевание часто встречается в рамках наследственных опухолевых синдромов и должно вызывать соответствующие подозрения. У больного также наблюдался выраженный семейный анамнез. Мутация p.R621X была описана в первой работе, посвященной синдрому Линча в России (Maliaka et al., 1996). Также ее обнаруживали в США в семье французского происхождения (Weber et al., 1997), Нидерландах (Berends et al., 2001), Венгрии (Papp et al., 2007).

Любопытной находкой является выявление необычной соматической мутации в гене MLH1 у семидесятилетней пациентки: p.L697Sfs*86_ext26 (c.2089delT). Эта мутация обнаружена впервые. Она приводит к сдвигу рамки считывания и удлинению белка на 26 аминокислот. О функциональном значении такой «элонгирующей» мутации судить сложно, однако известен пример северо-итальянской “founder”-мутации, в которой еще дальше к 3' концу гена MLH1 происходит инсерция T (c.2269_2270insT), приводящая к удлинению белка на 33 аминокислоты (Viel et al., 1998; Ponz de Leon et al., 2004; Caluseriu et al., 2004). Патогенность «итальянской» мутации убедительно доказана, и, наверное, эти сведения могут быть экстраполированы на выявленное нами соматическое повреждение гена MLH1.

Во время проведения настоящей диссертационной работы вышло еще одно российское исследование, посвященное изучению молекулярной эпидемиологии синдрома Линча. Обобщение данных различных исследований синдрома в России, включая наше, см. в Таблице 7. Итак, если рассматривать результаты настоящего исследования изолированно, можно сказать, что нами впервые установлен повторяющийся характер мутации p.R226L в гене MLH1 в российской популяции, так как в данном исследовании мутация выявлена дважды у неродственных лиц. Поставив наши данные в контекст других работ, можно отметить, что к настоящему времени описано 23 неродственных случая синдрома Линча в России. Среди них мутация p.R226L встретилась в 3/23 (13%) (настоящее исследование и данные, полученные нами ранее), мутация p.R621X в гене MSH2 - в 2/23 (9%) (Maliaka et al., 1996, настоящее исследование), мутация p.K618del в гене MLH1 – также в 2/23 (9%) (Поспехова et al., 2014). Таким образом, на данный момент может быть зафиксировано, что на долю трех повторяющихся в России мутаций приходится около трети (7/23, 30,4%) случаев синдрома Линча. Исходя из этого можно рекомендовать ступенчатый алгоритм молекулярно-генетической диагностики синдрома Линча: первоначальная проверка статуса трех локусов повторяющихся мутаций, и лишь при получении негативного результата - продолжение исследования полной кодирующей последовательности генов системы MMR.

Говоря об ограничениях настоящей работы, следует отметить, что вклад мутации p.R226L в структуру патогенных повреждений при синдроме Линча может оказаться меньше, чем установленный на текущий момент, так как одна из трех описанных мутаций была выявлена в результате целенаправленного поиска в селектированной группе больных с MSI-H опухолями.

Таблица 7. Патогенные мутации в генах системы MMR, выявленные в России:

Исследование	Выявленные мутации (сохранено авторское наименование мутаций)
Maliaka et al., 1996	MSH2: p.G322D, p.L376fs и p.R621X
Поспехова et al., 2014	MLH1: p.R100X, p.R100P, p.Lys618del (дважды), c.546-2A>G, p.C680R, p.691delAT, c.1896+1G>C MSH2: c.942+3A>T MSH6: p.I745N
Данная работа и	1) Случай, выявленный нашим коллективом до начала данной работы

результаты, полученные нашим коллективом до ее начала	MLH1: p.R226L и p. R659X MSH2: p.N139fs*, p.A636P и p.E878fs*3 2) Идентификация новых случаев и мутации, выявленные случайно: MLH1: p. R226L, p. I637Lfs*6, p.A681T MSH2: p.R621X 3) Целенаправленный поиск определенных мутаций: MLH1: p.R226L
---	---

Семейный аденоматозный полипоз

В настоящей работе представлены результаты изучения молекулярной эпидемиологии САП на выборке российских пациентов. Из-за высокого давления очищающего отбора “традиционные” “founder”-мутации для этого заболевания нехарактерны, и очень немногим популяциям свойственен в данном отношении “founder”-эффект. Это популяция Балеарских островов (Gonzales et al., 2005), Ньюфаундленда (Spurio et al., 1999) и США, где, фактически, речь идет о представителях одной разветвленной семьи (Neklason et al., 2008). Кроме того, в США продемонстрировано “founder” повреждение, ассоциированное с атипичной формой болезни, связанной с преимущественным поражением верхних гастроинтестинальных отделов (Rohlin et al., 2011; Snow et al., 2015; Li et al., 2016).

Также в APC существуют две «горячие точки мутагенеза», p.Q1062fs* и p.E1309Dfs*4, на которые в большинстве исследованных популяций приходится существенная доля, 5-40% (обычно 15-20%) причинно-значимых повреждений (Chiang et al., 2010; Friedl et al., 2005; Gómez-Fernández et al., 2009; Kerr et al., 2013; Kim et al., 2005; Lagarde et al., 2010; Papp et al., 2016; Pilawski et al., 2008).

До начала настоящей работы о спектре мутаций в гене APC в России было известно, что разнообразие мутаций велико, однако около трети приходится на мутации p.Q1062fs* и p.E1309Dfs*4 (Музаффарова, 2005). Сведения о небольшой выборке больных были опубликованы в 2011 году (Коротаева et al., 2011). Нам представлялось целесообразным воспроизвести и уточнить данные этих пилотных работ. Во время выполнения диссертационного исследования были опубликованы результаты еще одной московской работы, в которой доля мутаций p.Q1062fs* и p.E1309Dfs*4 оказалась меньше (2/13 (15%)) (Поспехова et al., 2014).

При исследовании группы больных полипозом толстой кишки различной степени выраженности нам удалось выявить мутации в гене APC в 20/30 (66%) случаев. Из них 6/20 (30%) составили мутации p.Q1062fs* и p.E1309Dfs*4. Интересно, что лишь эти два повреждения являются общими между больными из нашей когорты и участниками московского исследования (Поспехова et al., 2014). Новыми мутациями являлись 5/20 (25%) повреждений: p.K73Nfs*6, p.S254Hfs*49, p.S1072Kfs*9, p.E1547Kfs*11, p.L1564X. Остальные обнаруженные мутации (15/20 (75%)) встречались хотя бы в одной работе или базе данных: p.R232X (Rivera et al., 2010), p.E422X (Grandval et al., 2015), c.1312+5G>A (Aretz et al., 2004), c.1958+1G>A (Aretz et al., 2004), p.E658Tfs*11 (Grandval et al., 2015), p.Q978X (Plawski et al., 2008), p.Y796Wfs*2 (Papp et al., 2016), p.S1189X (Grandval et al., 2015), делеция всей последовательности гена APC (Nielsen et al., 2007).

Делеция всей последовательности гена APC была выявлена нами при помощи MLPA – этот метод не позволяет определять границы повреждения. Поэтому невозможно сказать, является ли найденная делеция уникальной для нашей популяции, или же, напротив, относится к уже известным мутациям. Из всех разновидностей затрагивающих ген небольших хромосомных перестроек делеция гена встречается наиболее часто (Nielsen et al., 2007).

Подавляющее большинство идентифицированных повреждений было представлено инактивирующими мутациями («транквирующие» повреждения, делеция всего гена): 18/20

(90%). Две другие мутации располагались в донорских сайтах сплайсинга 3' от 9 экзона (с.1312+5G>A) и 3' от 14 экзона (с.1958+1G>A), и их патогенность, на первый взгляд, неочевидна. Однако эти наследственные дефекты описаны у немецких больных с классическим фенотипом семейного аденоматозного полипоза: они приводят к выпадению из транскрипта гена APC соответствующих экзонов (Aretz et al., 2004).

Нужно заметить, что в разграничении классической и аттенуированной формы синдрома есть определенная условность, хорошо иллюстрируемая примером из нашей работы. Действительно, у носительницы мутации p.K73Nfs*6 (с.219_220insTA), расположенной в регионе гена APC, ассоциированном с аттенуированным фенотипом, заболевание манифестировало в позднем возрасте, но проявилось сразу в виде пяти синхронных первично-множественных РТК.

Переходя к выводам из данного раздела настоящей работы, можно отметить, что она хорошо согласуется с результатами, полученными московской исследовательницей в 2005 году (Музаффарова, 2005). 30% выявляемых в гене APC мутаций приходится на два повторяющихся повреждения: p.Q1062fs* и p.E1309Dfs*4, из чего закономерно следуют практические рекомендации о внедрении ступенчатой диагностики синдрома. Интересно, что со времени пионерской работы 2005 года доля новых мутаций в структуре выявляемых повреждений снизилась с 50% до 25%: очевидно, по мере накопления данных становятся известными все более и более редкие аллели. Представляется важным, что с помощью MLPA можно выявить дополнительные случаи САП.

MUTYH-ассоциированный полипоз

В настоящей работе представлены результаты изучения молекулярной эпидемиологии МАП в российской популяции. Надо отметить, что не только в России, но и в мире из трех частых разновидностей наследственного рака толстой кишки эта форма изучена хуже других, несмотря на ее относительно высокую встречаемость (0,1-1% неселектированных РТК) (Küry et al., 2007; Croitoru et al., 2004). Причина недостаточной изученности в том, что МАП «трудноуловим» – это рецессивное заболевание с неяркой клиникой. В современной социальной и демографической ситуации редко встречаются крупные семьи, позволяющие легко выявить рецессивный тип наследования заболевания. Обычно случаи MUTYH-ассоциированного полипоза представлены изолированными, а не семейными случаями. Средний возраст больных составляет 46-58 лет (Nielsen et al., 2009). Тот факт, что средний возраст превышает 50 лет у носителей гипоморфных мутаций, делает отбор больных на диагностику по возрасту не только малоспецифичным (Landon et al., 2015), но и низко чувствительным (Knoppertz et al., 2013). Типичная клиника МАП – аттенуированный фенотип полипоза толстой кишки (10-100 полипов). Обычный подход к выявлению МАП – генотипирование больных с полипозом толстой кишки после исключения мутаций в гене APC.

Около трети носителей биаллельных мутаций в гене MUTYH имеют менее 10 полипов (Farrington et al., 2005; Landon et al., 2015). Надо заметить, что выраженность полипоза при МАП не коррелирует с вероятностью возникновения РТК – пренебречь случаями с малым количеством полипов или их отсутствием нельзя (Nieuwenhuis et al., 2012). По-видимому, это происходит оттого, что для синдрома может быть характерно два феномена – повышенное образование аденоматозных полипов и их ускоренная малигнизация, причем экспрессивность этих феноменов не всегда одинакова и не всегда согласована. Ускоренное озлокачествление полипа - свойство, хорошо известное для синдрома Линча - здесь, вероятно, связано с аналогичными тому причинами. MUTYH-ассоциированные новообразования гипермутабельны, так как белок MUTYH – участник системы эксцизионной репарации оснований ДНК. Гипермутабельность при МАП носит избирательный характер: в опухолях, в частности, встречается только один тип

повреждений в гене KRAS (p.G12C) из множества возможных, причем частота этих мутаций выше, чем в типичных РТК. В современных условиях почти все метастатические карциномы толстой кишки тестируют на наличие мутаций в гене KRAS. Поэтому был предложен новый критерий селекции больных на молекулярно-генетическую диагностику: наличие соматической мутации p.G12C в гене KRAS. Опыт применения этого подхода небольшой, есть две работы на сериях пациентов – среди таких больных мутации выявляют в 10-25% случаев (Puijtenbroek et al., 2008; Aime et al., 2015). Одной из наших задач было попытаться апробировать оба подхода выявления МАП.

Наконец, следует сказать, что в диагностике синдрома большую роль играют “founder”-мутации, главным образом две европейские мутации p.Y179C и p.G396D: в большинстве популяций Европы на их долю приходится порядка 60-90% патогенных аллелей. Обычный алгоритм диагностики – ступенчатый: генотипируют эти две мутации, а затем проверяют наличие иных повреждений среди выявленных гетерозиготных носителей. Однако у народов неевропейского происхождения мутации p.Y179C и p.G396D не являются частыми. Если ограничиться изолированным применением ступенчатого подхода, в смешанных популяциях, таких как население США, можно «пропустить» около 25% случаев синдрома (Inra et al., 2015). Проверка адекватности такого подхода в нашей популяции являлась одной из задач настоящей работы. До проведения нашего исследования о структуре патогенных мутаций MUTYH в России было известно крайне мало: в работе (Музаффарова, 2005) был выявлен 1 пациент с гомозиготной мутацией p.Y179C. В более позднем исследовании (Коротаяева et al., 2011) выявлен еще один больной с гомозиготной мутацией p.Y179C и один – с гомозиготной мутацией p.G396D. В проведенном одновременно с нашим исследованием (Поспехова et al., 2014) был выявлен 1 больной с гомозиготной мутацией p.G396D. Любопытно, что еще были выявлены два пациента с мутацией p.G183D. Значимость последней мутации не доказана, но это повреждение наблюдалось в сочетании с мутацией p.Y179C у польского больного (Skrzypczak et al., 2006). Вызывает удивление, что этот аллель не встретился в дальнейшем в нашей выборке.

Итак, в группе из 10 больных полипозом толстой кишки без мутаций в гене APC нами было выявлено 2 (20%) пациента с биаллельными повреждениями гена MUTYH: [p.R245H];[p.G396D] и [p.P295L];[p.Q416X]. Частота синдрома в этой группе больных согласуется с мировыми данными (12-24%) (Dallosso et al., 2008; Gómez-Fernández et al., 2009; Papp et al., 2016; Nielsen et al., 2005; Sampson et al., 2003; Kairupan et al., 2005; Jo et al., 2005; Bouguen et al., 2007; Cattaneo et al., 2007).

Обсуждая спектр обнаруженных мутаций, надо сказать, что на замену p.R245H приходится 3% патогенных аллелей среди немецких больных МАП (Aretz et al., 2006), а также совсем недавно было установлено, что эта мутация является ведущим “founder”-дефектом в Венгрии (Papp et al., 2016). Мутация p.P295L несколько раз встречалась ранее при МАП в европейских популяциях, например, в Германии (Vogt et al., 2009). Мутация p.Q416X присутствует в виде единичной ссылки на неопубликованные данные во французской базе данных о мутациях в гене MUTYH (Grandval et al., 2015; UMD-MUTYH). Необычный набор мутаций у пациентки № MG234, скорее всего, объясняется ее отличным от европейского этническим происхождением – больная имеет якутские корни. Применение ступенчатого подхода к молекулярно-генетической диагностике в данном случае привело бы к ложно-негативному результату.

Генотипирование частых европейских мутаций позволило выявить 3 случая МАП в когорте из 91 РТК с характерной для МАП соматической мутацией в гене KRAS. Тестирование гетерозигот позволило обнаружить еще три случая: [p.L111P];[p.G396D], [p.R245H];[p.G396D] и [p.Q293X];[p.G396D]. Таким образом, в этой группе частота больных с MUTYH-ассоциированным полипозом достигла 6/91 (7%). Мутация p.Q293X – новая, однако патогенность ее сомнений не вызывает в силу «транквирующего» характера

повреждения гена. Мутация p.L111P также встретилась впервые, и достаточно сложно доказать ее значимость. Однако в том же кодоне встречается патогенное повреждение L111V (Guarinos et al., 2014), что служит косвенным, но достаточно убедительным доказательством патогенности выявленной нами замены.

Мы обнаружили 2 образца, гетерозиготных по аллелям p.Y179C и p.R245H. Технические ограничения позволили лишь частично проскринировать кодирующую последовательность MUTYH в этих образцах, поэтому исключить возможность биаллельного повреждения нельзя.

С целью установить вклад МАП в заболеваемость РТК в целом мы оценили встречаемость повторяющихся мутаций (p.Y179C, p.R245H и p.G396D) в 167 неселектированных случаях РТК. Носителей биаллельных мутаций мы не обнаружили, однако было выявлено 2 случая гетерозиготного носительства аллелей p.R245H и p.G396D. В силу технических сложностей не удалось проверить всю кодирующую последовательность MUTYH у этих больных.

Наконец, мы определили частоту трех повторяющихся мутаций в крупной выборке здоровых доноров. В коллекции из 1120 образцов были выявлены все три повреждения MUTYH. Совокупная аллельная частота патогенных вариантов составила в популяции 0,67%. Таким образом, расчетная частота случаев синдрома, приходящихся на повторяющиеся повреждения в гене MUTYH, составляет 1:22957 человек. Это несколько меньше аналогичных расчетных величин в европейских популяциях, составляющих порядка 1:7695-1:15625 (Aretz et al., 2014). При этом гетерозиготная мутация p.Y179C была обнаружена в 2/1120 (0,2%) случаев, p.R245H - в 1/1120 (0,1%) случаев и p.G396D – в 12/1120 (1,1%).

Рассматривая 8 выявленных нами случаев биаллельного носительства патогенных аллелей, можно отметить, что мутация p.G396D составила 7/16 (44%) от всех патогенных аллелей, мутация p.Y179C – 3/16 (19%), мутация p.R245H – 2/16 (13%). Всего в исследованных случаях РТК нами было выявлено 20 патогенных аллелей. На мутацию p.G396D пришлось 8/20 (40%) аллелей, на мутацию p.Y179C – 4/20 (20%), на мутацию p.R245H - 4/20 (20%). Аллели, выявленные единожды, в совокупности также составили пятую часть в структуре патогенных аллелей: 4/20 (20%). Структура аллелей в группе здоровых доноров достоверно отличалась от распределения патогенных вариантов в группе носителей мутаций, больных РТК; самым значительным при этом было отличие от носителей моноаллельных повреждений. Это известный феномен, связанный с гипоморфным характером мутации p.G396D (Nielsen et al., 2009; Ali et al., 2008). Ее встречаемость снижается в группах больных по сравнению с более высокопенетрантными повреждениями.

Итак, частоты выявляемых случаев МАП для нашей популяции не отличаются от типичных при применении двух протестированных подходов к селекции больных на молекулярно-генетическую диагностику. Среди российских больных МАП не столь редко встречаются пациенты отличного от европейского этнического происхождения, поэтому применение ступенчатого подхода к молекулярно-генетической диагностике МАП вполне оправданно лишь как предварительный этап. Если не удастся выявить частые повреждения, то требуется анализ всей последовательности гена MUTYH.

Идентификация повторяющейся мутации p.R245H является ценным результатом настоящего исследования. Представляется необходимым включение данной мутации в панель для скрининга больных в рамках ступенчатого подхода к диагностике.

Выводы

1. Мутация p.R226L в гене MLH1 имеет повторяющийся характер в российской популяции и встречается в 9-13% случаев синдрома Линча.
2. На два повторяющихся повреждения в гене APC, p.Q1062fs* и p.E1309Dfs*4, приходится 30% случаев семейного аденоматозного полипоза.
3. Биаллельные дефекты гена MUTYH встречаются с частотой 7% у больных РТК с соматической мутацией p.G12C в гене KRAS.
4. Впервые обнаружен повторяющийся характер мутации p. R245H в гене MUTYH в российской популяции.
5. Расчетная популяционная частота случаев MUTYH-ассоциированного полипоза, связанных с тремя повторяющимися в России мутациями, составила 1:22957, что приблизительно в 1,5-3 раза меньше, чем аналогичные показатели для европейских популяций (1:7695-1:15625).

Практические рекомендации

1. При проведении молекулярно-генетического анализа для выявления синдрома Линча целесообразно внедрение предварительного генотипирования трех мутаций: p.R226L в гене MLH1, p.R621X в гене MSH2, и, возможно, p.K618del в гене MLH1. Повторяющийся характер последнего повреждения, не выявленного в ходе настоящей диссертационной работы, известен по данным литературы.
2. При проведении молекулярно-генетического анализа для выявления наследственных мутаций в гене APC целесообразно внедрение предварительного тестирования на мутации p.Q1062fs* и p.E1309Dfs*4.
3. Наличие соматической мутации p.G12C в гене KRAS при РТК может служить поводом к тестированию больного на наличие наследственных мутаций в гене MUTYH, так как в этой группе пациентов биаллельные дефекты MUTYH встречаются с частотой 7%.
4. При проведении молекулярно-генетического анализа для выявления наследственных мутаций в гене MUTYH целесообразно внедрение предварительного тестирования не только на повторяющиеся мутации p.Y179C и p.G396D, но и на мутацию p. R245H.
5. Больным MUTYH-ассоциированным полипозом не европейского этнического происхождения показано определение всей последовательности гена MUTYH.

Перспективы разработки темы

Представляется целесообразным продолжение молекулярно-эпидемиологических исследований, направленных на уточнение частоты и спектра мутаций, ассоциированных с частыми формами наследственного рака толстой кишки в России. Также представляется важным изучение клинико-биологического своеобразия наследственных форм РТК, особенно недоизученного MUTYH-ассоциированного полипоза

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Ivantsov A.O., Yanus G.A., Kleshchov M.A., Shelekhova K., Imyanitov E.N., Iyevleva A.G. CD8-positive cytotoxic T-lymphocytes in colorectal carcinomas (CRCs): association with high-level microsatellite instability (MSI-H) or germ-line MUTYH mutation // XXXI International Congress of the International Academy of

- Pathology and 28th Congress of the European Society of Pathology. 25-29 September 2016. Virchows Archiv, European Journal of Pathology, 2016, Vol. 469, Supplement 1, P. S155. PS-16-035.**
2. **Иванцов А.О., Янус Г.А., Суспицын Е.Н., Анисимова Е.И., Имянитов Е.Н. Молекулярные маркеры чувствительности и резистентности карцином толстой кишки к терапии антагонистами EGFR // Сибирский онкологический журнал, 2016, Т. 15, №1, С. 59-66.**
 3. Кулигина Е.Ш., Соколенко А.П., Жегло Д., Янус Г.А., Picciolini M., Имянитов Е.Н. Анализ клональной независимости происхождения парных опухолей от пациентов с билатеральным раком молочной железы с помощью методов полногеномного анализа // 1-й Российский онкологический научно-образовательный форум с международным участием «Белые Ночи – 2015». 8–10 июня 2015 г., Санкт-Петербург. Сборник тезисов. С. 409-410.
 4. Суспицын Е.Н., Янус Г.А., Ледашева Т.А., Дорофеева М.Ю., Имянитов Е.Н. ДНК-диагностика туберозного склероза в России // 1-й Российский онкологический научно-образовательный форум с международным участием «Белые Ночи – 2015». 8–10 июня 2015 г., Санкт-Петербург. Сборник тезисов. С. 505.
 5. Янус Г.А., Иванцов А.О., Клещёв М.А., Иевлева А.Г. CD8-положительные цитотоксические Т-лимфоциты в колоректальных карциномах: ассоциация с высокой микросателлитной нестабильностью и наследственными мутациями в гене MUTYH // II Петербургский онкологический форум «Белые Ночи – 2016» (Петровские чтения). 22–24 июня 2016 г., Санкт-Петербург. Сборник тезисов. С. 341-342.
 6. Янус Г.А., Преображенская Е.В., Ахапкина Т.А., Пашков Д.В., Иванцов А.О., Иевлева А.Г., Имянитов Е.Н. Молекулярно-генетические аспекты диагностики MUTYH-ассоциированного полипоза толстой кишки // II Петербургский онкологический форум «Белые Ночи – 2016». 22–24 июня 2016 г., Санкт-Петербург. Сборник тезисов. С. 364-365.
 7. Янус Г.А., Суспицын Е.Н., Корнилов А.В., Имянитов Е.Н. Спектр наследственных мутаций в гене APC при семейном аденоматозном полипозе // 1-й Российский онкологический научно-образовательный форум с международным участием «Белые Ночи – 2015». 8–10 июня 2015 г., Санкт-Петербург. Сборник тезисов. С. 495-496.
 8. Янус Г.А., Суспицын Е.Н. Анализ частоты микросателлитной нестабильности в последовательных случаях колоректального рака // Тезисы 10-й конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения-2014», 10 апреля 2014 г., Санкт-Петербург, С. 105.
 9. **Раскин Г.А., Янус Г.А., Корнилов А.В., Орлова Р.В., Петров С.В., Протасова А.Э., Пожарисский К.М., Имянитов Е.Н. Иммуногистохимическое исследование MSH2, PMS2, MLH1, MSH6 в сопоставлении с анализом микросателлитной нестабильности в аденокарциноме толстой кишки // Вопросы онкологии, 2014. № 2., Т. 60, С. 47-50.**
 10. **Bogdanova N., Togo A.V., Ratajska M., Kluźniak W., Takhirova Z., Tarp T., Prokofyeva D., Bermisheva M., Yanus G.A., Gorodnova T.V., Sokolenko A.P., Kuźniacka A., Podolak A., Stukan M., Wokolorczyk D., Gronwald J., Vasilevska D., Rudaitis V., Runnebaum I.B., Dürst M., Park-Simon T.W., Hillemanns P., Antonenkova N., Khusnutdinova E., Limon J., Lubinski J., Cybulski C., Imyanitov E., Dörk T. Prevalence of the BLM nonsense mutation, p.Q548X, in ovarian cancer patients from Central and Eastern Europe // Fam Cancer, 2014, Vol. 14(1), P. 145-149.**

11. Gorodnova T.V., Sokolenko A.P., Ivantsov A.O., Iyevleva A.G., Suspitsin E.N., Aleksakhina S.N., Yanus G.A., Togo A.V., Maximov S.Y., Imyanitov E.N. High response rates to neoadjuvant platinum-based therapy in ovarian cancer patients carrying germ-line BRCA mutation // *Cancer Lett*, 2015. Vol. 369(2), P. 363-367.
12. Novik A.V., Protsenko S.A., Baldueva I.A., Ivantsov A.O., Nekhaeva T.L., Akhaeva Z.Y., Yanus G.A., Iyevleva A.G., Imyanitov E.N. Vemurafenib-induced progression of breast cancer: a case report and review of the literature // *Target Oncol*, 2015. (P. 1-4
13. Sokolenko A.P., Bulanova D.R., Iyevleva A.G., Aleksakhina S.N., Preobrazhenskaya E.V., Ivantsov A.O., Kuligina E.Sh., Mitiushkina N.V., Suspitsin E.N., Yanus G.A., Zaitseva O.A., Yatsuk O.S., Togo A.V., Kota P., Dixon J.M., Larionov A.A., Kuznetsov S.G., Imyanitov E.N. High prevalence of GPRC5A germline mutations in BRCA1-mutant breast cancer patients // *Int J Cancer*, 2014, Vol. 134(10), P. 2352-2358.
14. Suspitsin E.N., Yanus G.A., Sokolenko A.P., Yatsuk O.S., Zaitseva O.A., Bessonov A.A., Ivantsov A.O., Heinstein V.A., Klimashevskiy V.F., Togo A.V., Imyanitov E.N. Development of breast tumors in CHEK2, NBN/NBS1 and BLM mutation carriers does not commonly involve somatic inactivation of the wild-type allele // *Med Oncol*, 2014, Vol. 31, P. 828 (1-7).

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность научному руководителю диссертационной работы, профессору Евгению Наумовичу Имянитову за ценные, глубокие советы по вопросам диссертационной работы и многим иным, постоянное внимание и неоценимую помощь. Приношу глубокую благодарность к.м.н. А.Г. Иевлевой за редакторские замечания и моральную поддержку, к.м.н. А.О. Иванцову за помощь в подготовке гистологического материала. Выражаю искреннюю признательность друзьям и коллегам, сотрудникам лаборатории молекулярной онкологии: к.м.н. А.В. Того, к.м.н. Е.Н. Суспицыну, к.м.н. Н.В. Митюшкиной, к.м.н. Е.Ш. Кулигиной, к.м.н. А.П. Соколенко, С.Н. Алексахиной, Е.В. Преображенской, А.Р. Вениной, Т.Н. Стрелковой, В.И. Тюрину, Т.А. Ахапкиной, О.А. Зайцевой, О.С. Яцук, Т.П. Кутиловой и другим за помощь в работе и доброжелательное отношение.