

На правах рукописи

ЦУКАНОВ АЛЕКСЕЙ СЕРГЕЕВИЧ

**СТРАТЕГИЯ КОМПЛЕКСНОГО
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ
НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФОРМ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА
У РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ**

03.02.07 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Москва – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации и Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Медико-генетический научный центр»

Научные консультанты:

Шельгин Юрий Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Поляков Александр Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией ДНК-диагностики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр»

Официальные оппоненты:

Имянитов Евгений Наумович - доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий научным отделом Федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Акуленко Лариса Вениаминовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой медицинской генетики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Асанов Алий Юрьевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой медицинской генетики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Ростовский научно-исследовательский онкологический институт" Министерства здравоохранения Российской Федерации "

Защита диссертации состоится «__» _____ 2017 года в __ на заседании Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 001.016.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Медико-генетический научный центр» по адресу: 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр» по адресу: 115478, Москва, ул. Москворечье, д.1.

Автореферат разослан «__» _____ 2017

Ученый секретарь Диссертационного совета
Д 001.016.01 по защите диссертаций на соискание
ученой степени кандидата наук,
на соискание ученой степени доктора наук,
доктор медицинских наук, профессор

Зинченко Рена Абульфазовна

Общая характеристика работы

Актуальность исследования

В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями в Российской Федерации в 2015 году у пациентов обоих полов рак толстой кишки (РТК) занимал 2 место с показателем 11% среди всех онкологических заболеваний. В структуре смертности от онкологических новообразований РТК также занимает второе место с показателем 13,6%, поскольку в половине случаев у пациентов выявляется колоректальный рак уже на 3-4 стадии заболевания. В последние 10 лет среднегодовой темп прироста заболеваемости составил около 2% (Каприн А.Д. и др., 2017). Частота РТК с наследственной предрасположенностью составляет примерно 10% (Kastrinos F., Syngal S., 2011). Фундаментальные исследования в области колоректального канцерогенеза позволили выявить гены, герминальные мутации которых объясняют возникновение наследственного колоректального рака. Это гены *APC*, гены MMR (система mismatch repair), *STK11* и др. (Kinzler, K. et al., 1991; Thibodeau S. et al., 1993; Hemminki, A. et al., 1998). Ещё примерно в половине случаев данная предрасположенность прослеживается благодаря наличию семейного анамнеза, но на данный момент не имеет описанной генетической причины (наследственной мутации в определенном гене) (Kastrinos F., Syngal S., 2011). К наследственным синдромам с известной генетической причиной относятся синдром Линча, семейный аденоматоз толстой кишки (САТК) и *МУН*-ассоциированный полипоз, а также гамартонные полипозные синдромы (Пейтца-Егерса, Коудена и ювенильный полипоз). Интерес к этим формам заболевания обусловлен следующими факторами: во-первых, РТК при данных синдромах может развиваться в возрасте до 35-40 лет, что существенно раньше, чем в общей популяции; во-вторых, обнаружение наследственной мутации у больного подразумевает ее поиск у всех кровных родственников пациента, что, безусловно, приведет к тщательному клиническому мониторингу всех носителей мутации для выявления возможного рака на ранней стадии; наконец, развитие рака у носителя мутации предполагает определение индивидуального объема оперативного вмешательства с учетом высокого риска метакронного поражения оставшихся отделов толстой кишки (Schlussel A. et al., 2014).

Несмотря на проводимые в последние годы мультицентровые исследования клинико-генетических характеристик пациентов с наследственными формами РТК, по-прежнему остается не разрешенным ряд весьма существенных вопросов. Так, не смотря на наличие нескольких широко известных рекомендаций по отбору больных с синдромом Линча – ни одна из них не позволяет выявлять всех носителей герминальных мутаций с высокой чувствительностью. Кроме того, риски развития, а также возраст возникновения рака практически любой локализации у такого рода больных установлены недостаточно точно, что не позволяет разработать рекомендации клинического мониторинга определенного органа на предмет возможной злокачественной трансформации. Существенным, не решенным вопросом, остается локализация первой опухоли в разных отделах толстой кишки и предполагаемый объем оперативного вмешательства. Большое количество генов, наследственные мутации в которых обуславливают синдром Линча, требует разработки эффективного алгоритма молекулярно-генетических исследований при подозрении на данный синдром. Не вполне ясно насколько целесообразно у больных с аденоматозным полипозом выделять тяжелую и классическую формы заболевания, если развитие злокачественного новообразования неизбежно в обоих случаях, а также в каком возрасте при подобном делении необходимо выполнять хирургическую операцию у

конкретного пациента. Данные о том, что локализация мутации в гене *APC* всегда определяет классический или тяжелый вариант развития аденоматозного полипоза требуют уточнения. Кроме того, остаются вопросы по нижней границе числа полипов при ослабленной форме заболевания, которая позволила бы дифференцировать такого рода больных от пациентов со спорадическими полипами, что важно для определения объема оперативного вмешательства. Имеются противоречивые данные по значимости гетерозиготных мутаций в гене *MutYH* для риска развития аденоматозного полипоза у пациентов из разных популяций (Al-Tassan N. et al, 2002; Enholm S. et al, 2003; Theodoratou E. et al, 2010). Редкая встречаемость синдрома Пейтца-Егерса не позволяет считать полученные данные по молекулярно-генетическим и фенотипическим особенностям такого рода пациентов окончательными, соответственно, требуется продолжение клинико-генетических исследований.

Наблюдаются значительные различия в распределении мутаций в разных популяциях (Attard T. et al., 2007; Pérez-Cabornero L. et al, 2013). В связи с этим, определение характеристик мутаций в популяциях важно, как с фундаментальной точки зрения, так и для решения практических задач медицинской генетики. Данные о взаимосвязи генотипа и фенотипа позволят разработать и внедрить клинические критерии по отбору пациентов с подозрением на наследственную форму РТК, а также предложить для них персонифицированный подход как, к клиническому мониторингу, так и к возможному хирургическому лечению.

К сожалению, в России возможности ранней диагностики РТК реализованы недостаточно полно, в связи, с чем у 50% первичных больных обнаруживаются уже III-IV стадии заболевания (Каприн А.Д. и др., 2017). При этом выявление герминальной мутации в одном из генов предрасположенности является крайне актуальным критерием для формирования групп риска. Подобная информация весьма целесообразна в практической онкологии для индивидуализации диагностической, лечебной и профилактической тактики. Более ранний возраст развития наследственного РТК, его значительная доля в структуре заболеваемости дополнительно акцентирует важность изучения генов, ассоциированных с риском развития рака и практического использования полученных результатов. Создание алгоритма проведения ДНК-диагностики с учетом индивидуального и семейного анамнеза для выявления наследственной предрасположенности к раку толстой кишки создает базу для медико-генетического консультирования на принципиально новой основе.

Цель исследования

Разработать стратегию комплексного молекулярно-генетического обследования и рекомендации для лечения наследственных форм колоректального рака.

Задачи исследования

1. Разработать критерии отбора российских пациентов с подозрением на синдром Линча.
2. Оптимизировать молекулярно-генетический алгоритм поиска пациентов с синдромом Линча.
3. Установить отношение генотип-фенотип у пациентов с синдромом Линча.
4. Разработать алгоритм молекулярно-генетических исследований у больных с разными формами аденоматозного полипоза.
5. Установить целесообразность выделения тяжелой и классической формы аденоматозного полипоза в зависимости от локализации мутации в гене *APC*.

6. Разработать критерии для дифференциального диагноза между ослабленной формой аденоматозного полипоза и спорадическими полипами толстой кишки.
7. Установить клинические особенности и выявить молекулярно-генетические причины заболевания у пациентов с синдромом Пейтца-Егерса.

Научная новизна и теоретическая значимость

В России проблема комплексного молекулярно-генетического скрининга и персонализированной терапии наследственных форм колоректального рака требует скорейшего разрешения. Нами впервые предложены оригинальные критерии отбора и порядок молекулярно-генетического обследования российских пациентов при подозрении на синдром Линча. Определены показатели чувствительности данных критериев (89% и 100%), которые превысили аналогичные показатели широко известных Амстердамских (22%) и рекомендаций Bethesda (82%).

Впервые описана частота наследственных мутаций в генах системы репарации ДНК: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* и *PMS2* у российских пациентов с синдромом Линча, которая составила 51,4%, 37,8%, 5,4%, 2,7% и 2,7%, соответственно. Поскольку было найдено только 4 повторяющихся герминальные мутации (2 в гене *MLH1*, 2 в гене *MSH2*) целесообразно изучение всех кодирующих экзонов с прилегающими участками интронов. Частота не выявленных ранее герминальных мутаций составила 32,4% (12/37).

Установлена высокая частота герминальных мутаций в гене *APC* у пациентов, имевших более 100 аденоматозных полипов в толстой кишке (72,2%; 78/108). Число мутаций *de novo* составило 17, повторяющихся мутаций – 7, а впервые обнаруженных – 19. Впервые установлено, что миссенс-мутации (включая вариант p.I1307K) в гене *APC* не являются патогенными. Продемонстрировано отсутствие данных, позволяющих считать мутацию p.Glu1309AspfsX4 более агрессивной в сравнении с другими патогенными мутациями в гене *APC*, а, следовательно, не целесообразно выделять тяжелую форму аденоматозного полипоза. Впервые показано, что мутации в участке гена *APC* со 142 по 157 кодоны могут приводить не только к ослабленной, но и к классической форме семейного аденоматоза толстой кишки, что говорит о необходимости исследования всех кодирующих экзонов с прилегающими участками интронов данного гена. Введен критерий нижней границы ослабленной формы семейного аденоматоза толстой кишки. Впервые установлена значимость гетерозиготных мутаций в гене *MutYH* для развития аденоматозного полипоза ($p=0,019$).

У обследованных пациентов с синдромом Пейтца-Егерса установлена высокая частота встречаемости злокачественных новообразований, а также частое поражение гамартонными полипами толстой кишки и желудка. У 4 пациентов в гене *STK11* обнаружены герминальные мутации, 3 из которых описываются впервые.

Впервые разработана таргетная панель генов для секвенирования нового поколения (NGS) с целью определения наследственных форм колоректального рака.

Научно-практическая значимость

Разработан и внедрен в клиническую практику алгоритм проведения молекулярно-генетических исследований у пациентов с разными наследственными формами колоректального рака. Охарактеризованы частота и спектр герминальных мутаций в генах *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* и *PMS2* у пациентов с диагнозом синдром Линча, в генах *APC* и *MutYH* у больных с разными формами аденоматозного полипоза, а также в гене *STK11* у пробандов с синдромом Пейтца-Егерса. Предложены оригинальные критерии, позволяющие с высокой чувствительностью отбирать пациентов с подозрением на

синдром Линча. Установлена целесообразность начинать молекулярно-генетическое исследование при подозрении синдрома Линча с анализа образца опухоли на наличие микросателлитной нестабильности, а дальнейший поиск наследственных мутаций проводить только в случае ее выявления. Определены характеристики мутаций в гене *APC* у пациентов с наличием более 100 аденоматозных полипов в толстой кишке, которые демонстрируют отсутствие целесообразности выделения тяжелой формы заболевания у такого рода больных. При этом установлен возраст выполнения хирургического вмешательства, направленного на удаление толстой кишки у всех пациентов с классической формой аденоматозного полипоза, в не зависимости от локализации мутации в гене *APC*, который должен быть менее 25 лет, что позволит снизить количество случаев развития опухоли у больных в 10 раз. Показано, что у пациентов с наличием более 100 аденоматозных полипов необходимо исследовать все экзоны гена *APC*, а не только участки после 157 кодона. Продемонстрирована значимость гетерозиготных мутаций в гене *MutYH* в развитии аденоматозного полипоза. Установлена нижняя граница количества колоректальных полипов, позволяющая дифференцировать ослабленную форму аденоматозного полипоза от спорадических полипов – наличие 20 полипов в толстой кишке, что может помочь хирургу в определении объема оперативного вмешательства в случае диагностирования колоректального рака на фоне аденоматозных полипов. Определены характеристики мутаций в гене *STK11* у больных с синдромом Пейтца-Егерса, установлены особенности клинической картины пациентов, которые диктуют необходимость выявления такого рода пациентов в раннем возрасте. Предложена оригинальная таргетная панель для исследования пациентов с помощью метода секвенирования нового поколения. Зарегистрирована заявка на патент «Способ лечения рака толстой кишки II стадии».

Результаты проведенного исследования могут быть использованы при медико-генетическом консультировании больных, в чьих семьях встретились родственники с разными формами колоректального рака.

Положения, выносимые на защиту

1. Чувствительность разработанных оригинальных критериев отбора пациентов с синдромом Линча, учитывающих возраст развития колоректального рака и наличие отягощенного семейного анамнеза, составила 89% и 100% соответственно.
2. Всем пациентам, у которых предполагается наличие синдрома Линча необходимо первым этапом выполнять исследование образца опухоли на наличие микросателлитной нестабильности, а поиск герминальных мутаций осуществлять только в случае ее выявления.
3. У всех носителей мутации, обуславливающей синдром Линча, необходимо проведение ежегодной колоноскопии и эзофагогастродуоденоскопии, начиная с возраста 22 и 27 лет, соответственно. Всем женщинам показано ежегодное выполнение УЗИ матки с придатками и проведение маммографии, начиная с возраста 27 и 30 лет, соответственно. Носителям мутации в гене: *MSH2* необходимо проведение ежегодного обследования органов мочевыделительной системы и выполнение анализа мочи, начиная с возраста 32 лет; *PMS1* – ежегодное обследование щитовидной железы, начиная с возраста 40 лет; *MLH1* - ежегодное выполнение МРТ головы, начиная с 22 лет, если в семье встретился хотя бы один случай опухоли головного мозга.

4. Гетерозиготные мутации в гене *MutYH* могут приводить к развитию как ослабленной, так и классической формы аденоматозного полипоза. У пациентов с наличием более 100 аденоматозных полипов в толстой кишке показано исследование всех кодирующих экзонов гена *APC*.
5. Нет оснований, позволяющих выделять тяжелую форму аденоматозного полипоза в зависимости от локализации мутации в гене *APC*. В возрасте до 25 лет необходимо выполнять оперативное вмешательство у всех пациентов с классической формой аденоматозного полипоза.
6. Показана необходимость раннего выявления пациентов с синдромом Пейтца-Егерса для проведения своевременного клинического мониторинга, позволяющего удалять гамартонные полипы до начала их злокачественной трансформации.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует формуле специальности «03.02.07 – Генетика» (медицинские науки), охватывающей изучение проблем изменчивости и наследственности, закономерностей процессов хранения, передачи и реализации генетической информации на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях. Области исследования: «Молекулярные и цитологические основы наследственности»; «Процессы репликации, рекомбинации, репарации»; «Генетика человека. Медицинская генетика. Наследственные болезни». Настоящая работа посвящена совершенствованию подходов к изучению наследственных молекулярных аномалий в рамках персонализированной медицины.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждена верификацией полученных данных при использовании различных диагностических методов и методов статистического анализа. Результаты работы соответствуют данным, представленным в отечественной и зарубежной литературе. Изложенные в диссертационном исследовании положения, выводы и рекомендации являются достоверными.

Основные материалы диссертационного исследования были доложены на: Межрегиональной научно-практической конференции «Мультидисциплинарный подход к лечению больных раком прямой кишки и анального канала» (Москва, 2013); Научной конференции Европейского общества генетики человека (Париж, 2013); VIII Всероссийском съезде онкологов и колопроктологов «Онкология XXI века – от научных исследований в клиническую практику» (Санкт-Петербург, 2013); VIII Съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Казань, 2014); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы колопроктологии» (Смоленск, 2014); Научной конференции Европейского общества генетики человека (Милан, 2014); Отечественной Школе Онкологов (Санкт-Петербург, 2014); Международном объединенном конгрессе ассоциации колопроктологов России и первом ESCP/ECCO региональном мастер классе (Москва, 2015); XIX Форуме «Национальные дни лабораторной медицины России – 2015 г.» (Москва, 2015); Российско-Японском научно-образовательном семинаре (Москва, 2015); XIX Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2015); Первой Всероссийской научно-практической конференции «NGS в медицинской генетике» - MGNGS'16 (Суздаль, 2016); Первом съезде Европейской группы по исследованию наследственных злокачественных опухолей (Пальма-де-Майорка, 2016); Научной конференции Европейского общества генетики человека

(Барселона, 2016); IX Съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Минск, 2016); III Конгрессе общества специалистов по онкологической колопроктологии (Москва, 2016); XX Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2016); Научной конференции Европейского общества генетики человека (Копенгаген, 2017); II Ежегодном конгрессе ассоциации онкопатологов (Москва, 2017).

Разработанный алгоритм, был использован при выполнении научно-исследовательской работы по гранту Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - кандидатов наук (Конкурс - МК-2016), по теме «Клинические особенности и хирургическое лечение российских пациентов с синдромом Линча».

Методология и методы исследования

Методологической и теоретической основой диссертационного исследования послужили труды отечественных и зарубежных ученых в области молекулярной онкогенетики человека. В первую очередь это фундаментальные научные исследования в области колоректального канцерогенеза, которые позволили установить гены, герминальные мутации которых объясняют возникновение наследственных форм колоректального рака. Это гены *APC*, *MutYH*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *STK11* и др. Необходимо отметить, что появление перспективного метода секвенирования нового поколения позволяет проводить одновременное исследование большого числа генов сразу у нескольких больных с разными формами наследственного рака толстой кишки. Однако применение данного метода в клинической практике имеет ряд существенных ограничений, которые обусловлены большим объемом данных, полученных в результате секвенирования, а также его достаточно высокой себестоимостью.

Данное исследование направлено на создание эффективного алгоритма молекулярно-генетического изучения наследственных форм колоректального рака с использованием различных экспериментальных методов - от конформационно-чувствительного электрофореза в ПААГ, до метода высокопроизводительного секвенирования.

При проведении исследования был использован системный подход, который включал оригинальные методы отбора пациентов; выполнение молекулярно-генетических исследований с помощью следующих экспериментальных методов: ПЦР, электрофорез в ПААГ (конформационно-чувствительный электрофорез и метод SSCP), фрагментный анализ, секвенирование по Сэнгеру, секвенирование нового поколения; а также методы статистического анализа.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в определении направления исследования, а также организации и проведения всех этапов работы. Автором сформулирована цель и определены задачи исследования. Автором разработаны оригинальные критерии, позволяющие отбирать пациентов с подозрением на синдром Линча, а также определены показатели чувствительности и специфичности данных рекомендаций, кроме того установлена нижняя граница количества аденоматозных полипов в толстой кишке больных, с помощью которой проводился отбор пациентов с ослабленной формой семейного аденоматоза толстой кишки. Автор принимал участие в разработке и проведении молекулярно-генетических исследований. Автором проведены анализ и интерпритация полученных результатов с использованием различных компьютерных программ, позволяющих устанавливать функциональное значение обнаруженных наследственных вариантов.

Автором самостоятельно проанализирована отечественная и зарубежная литература по теме диссертации, проведен статистический анализ данных, сформулированы результаты и выводы, а также лично написана рукопись настоящей работы.

Публикации по теме исследования

По теме и материалам диссертационного исследования опубликовано 44 печатные работы, в том числе 19 статей в рецензируемых научных журналах, которые рекомендованы ВАК МОН РФ для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук и 1 заявка на получение патента.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания использованных в работе материалов и методов, результатов исследований и их обсуждений, заключения, выводов, применения результатов и научных выводов, списка опубликованных работ по теме диссертации и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 233 страницах машинописного текста, содержит 51 рисунок и 24 таблицы. Список цитируемой литературы включает 268 источников до 2017 года включительно, из которых 10 отечественных и 258 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования послужили образцы периферической крови 351 неродственного пациента с диагностированным колоректальным раком, или наличием аденоматозных / гамартомных полипов в толстой кишке и 150 человек контрольной выборки, проходивших лечение, клинический мониторинг или плановое эндоскопическое обследование толстой кишки в ФГБУ «ГНЦК им. А.Н. Рыжих» Минздрава России с октября 2012 по сентябрь 2016 года. Кроме того, исследовался 171 образец опухоли (биопсия, операционный или архивный материал). От всех пациентов и участников контрольной выборки, вовлеченных в исследование, было получено информированное согласие.

Для отбора пациентов, у которых предполагалась возможность обнаружения синдрома Линча, исследовалось 3 выборки больных неполипозным колоректальным раком (всего 171 неродственный пациент). В первую выборку включили 23 пациента (12 мужчин и 11 женщин) с отягощенным семейным анамнезом. Вторая выборка была сформирована из 56 больных (26 мужчин и 30 женщин), у которых в семье ранее не встречалось родственников со злокачественными новообразованиями. В третью выборку включали больных, у которых РТК развился в возрасте до 43 лет независимо от количества пораженных родственников, а также пациентов в возрасте старше 43 лет, в том случае, когда в их семье имелось еще 2 или более случаев злокачественных новообразований у родственников. Всего в третью группу было включено 92 пациента (44 мужчины и 48 женщин). У всех больных производился забор крови, а также отбирался материал опухоли (биопсия, операционный или архивный материал).

Для исследования пациентов с семейным аденоматозом толстой кишки были отобраны 108 пациентов (65 женщин и 43 мужчины до 45 лет), у которых при выполнении эндоскопического обследования в толстой кишке было обнаружено более 100

аденоматозных полипов. Для исследования пациентов с ослабленной формой полипоза отобраны 66 пациентов (30 женщин и 36 мужчин) в возрасте от 46 до 74 лет, у которых в толстой кишке было выявлено от 4 до 100 аденоматозных полипов. У всех больных производился забор крови.

Исследовано 8 пациентов (7 женщин и 1 мужчина) из 6 семей (в одной семье были обследованы мать и 2 детей) с диагнозом «синдром Пейтца-Егерса». У всех больных производился забор крови.

В контрольную выборку включено 150 пробандов (73 мужчины и 77 женщин), у которых в толстой кишке при проведении плановой колоноскопии по поводу синдрома раздраженного кишечника, геморроя или свищей прямой кишки, не было выявлено полипов или РТК, а их родители не страдали от злокачественных новообразований. У всех пробандов производился забор крови.

Методы исследования

Выделение геномной ДНК из лимфоцитов периферической крови и операционного материала, полученного сразу после выполнения хирургического вмешательства, производили с помощью набора «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» (ДНК технология, Россия); ДНК из парафиновых блоков с опухолевым материалом выделяли с помощью набора «TIANamp FFPE DNA Kit» (Tiangen, Китай); тотальную РНК выделяли из периферической крови пробандов с помощью набора PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific). Обратную транскрипцию проводили, используя набор ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega).

Методом полимеразной цепной реакции с использованием 101 пары праймеров амплифицировали все кодирующие экзоны генов *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *APC* и *MutYH*, с примыкающими частями интронов (50 – 100 п. н.). Исследование амплифицированных фрагментов гена *MutYH* проводили с помощью метода SSCP. Электрофорез проводили в 10% полиакриламидном геле (трис-боратный буфер, pH=8,9). Исследование амплифицированных фрагментов генов *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *APC* проводили с помощью метода конформационно-чувствительного электрофореза. Электрофорез проводили в 10% полиакриламидном геле (трис-глициновый буфер, pH=9).

Фрагменты ДНК с электрофоретически обнаруженными вариантами секвенировали с помощью прибора ABI PRISM 3500 (8 capillaries) (Applied Biosystems, США) согласно протоколу производителя. В качестве матрицы для секвенирования использовали фрагменты, полученные после проведения ПЦР. Анализ результатов секвенирования проводился с помощью программ Chromas и BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Исследование микросателлитных маркеров NR21, NR24, NR27, BAT25 и BAT26 проводили с помощью фрагментного анализа по протоколам ABI Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Для анализа образцов ДНК пациентов, у которых не было обнаружено герминальных мутаций в генах, исследованных с помощью методов конформационно-чувствительного электрофореза и метода SSCP, использовалась платформа для высокопроизводительного секвенирования Roche/454 GS Junior (Roche, Швейцария). Таргетная панель, используемая на этой платформе, позволила исследовать следующие гены: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *MLH3*, *EPCAM*, *APC*, *MUTYH*, *STK11*, *POLE*, *POLD*. Секвенирование проводилось согласно протоколу фирмы-производителя.

Для выяснения значения некоторых обнаруженных вариантов нуклеотидной последовательности в исследованных генах использовали программу предсказания сайтов сплайсинга NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>), а также программу выяснения патогенного значения наследственных вариантов «Mutation taster» (<http://www.mutationtaster.org>).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Statistica 13.0 и MedCalc 12.5.0.0. Параметрическое распределение непрерывных данных оценивали тестом Шапиро-Уилка. При параметрическом распределении непрерывных данных совокупность описывали средним и стандартным отклонением или 95% доверительным интервалом. Сравнение 2-х групп осуществляли с помощью t-критерия. При непараметрическом распределении совокупность описывали медианой и квартилями. Сравнение 2-х групп проводили критерием Манна-Уитни. Бинарные данные сравнивали с помощью критерия χ^2 , если ожидаемые частоты были ≥ 5 , в других случаях использовали двусторонний критерий Фишера. Для оценки факторов риска рассчитывали отношение шансов (odds ratio, OR). Для классификации на основе непрерывных данных оптимально предсказывающих бинарный исход применяли ROC-кривую.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск герминальных мутаций у пациентов с разными наследственными формами колоректального рака

Для поиска герминальных мутаций в генах-супрессорах опухоли у пациентов с наследственными формами РТК первоначально использовался метод электрофореза в ПААГ, а конкретнее два его варианта: конформационно - чувствительный электрофорез (CSGE) и метод анализа однострессового конформационного полиморфизма (SSCP). Мутации в генах *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* и *APC* анализировались методом конформационно - чувствительного электрофореза; метод SSCP применялся для исследования гена *MutYH* (Рис. 1). Фрагменты ДНК, идентифицированные в качестве измененных, в дальнейшем изучались с помощью секвенирования по методу Сэнгера (Рис. 2).

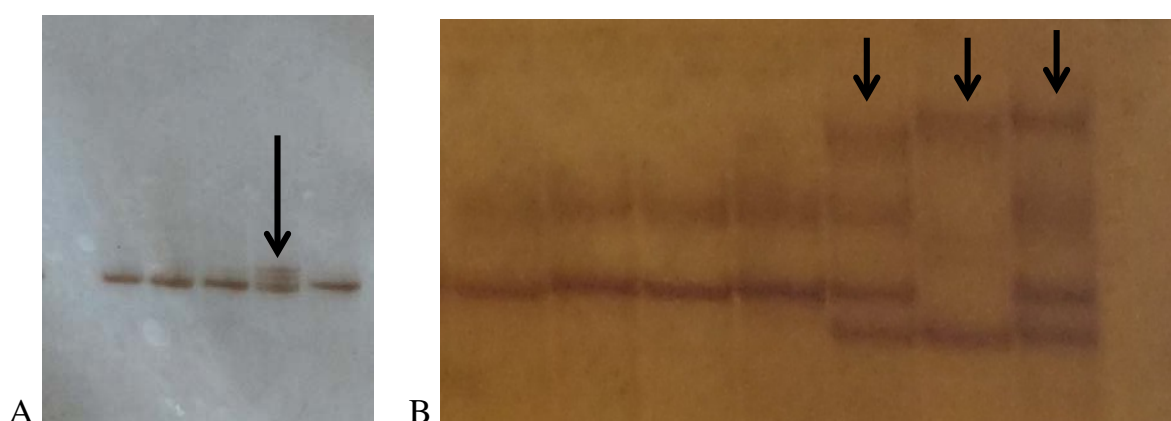


Рисунок 1. Примеры определения мутаций с помощью метода электрофореза.

Примечание: А – Электрофореграмма фрагмента ДНК 15 кодирующего экзона гена *APC* (стрелкой указан фрагмент с измененной подвижностью, в котором впоследствии была найдена наследственная мутация) с помощью метода конформационно - чувствительного электрофореза. В – Электрофореграмма фрагмента ДНК 7 кодирующего экзона гена *MutYH* (стрелками указаны

фрагменты с измененной подвижностью, в которых впоследствии были найдены наследственные мутации) с помощью метода SSCP.

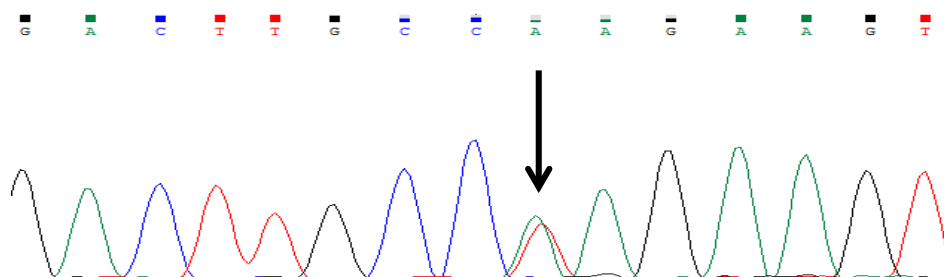


Рисунок 2. Сиквенс фрагмента гена *MSH2* (стрелкой указана наследственная мутация с.1174A>T).

Чувствительность как конформационно - чувствительного электрофореза, так и метода SSCP не достигает 100% и, соответственно, не позволяет выявлять все наследственные варианты в анализируемых генах. Важно отметить и довольно существенное число генов, помимо *MLH1*, *MSH2* и *MSH6*, мутации в которых обуславливают синдром Линча. В связи с этим было принято решение о целесообразности применения метода секвенирования нового поколения (NGS) для исследования ДНК тех пациентов, у которых мутации не были выявлены с помощью методов электрофореза в ПААГ. Этим методом исследовались следующие гены: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *MLH3*, *EPCAM*, *APC*, *MUTYH*, *STK11*, *POLE*, *POLD*.

Применение метода NGS позволило выявить герминальные мутации как в генах, проанализированных с помощью метода электрофореза в ПААГ, так и в других генах.

При изучении образцов ДНК пациентов, у которых предполагался синдром Линча, были выявлены герминальные мутации в гене *MSH2*, которые не были обнаружены ранее. Наследственные варианты найдены в генах *PMS1* и *PMS2*. Среди больных с наследственными аденоматозными полипозными синдромами были найдены мутации в генах *APC* и *MutYH* у ранее обследованных пациентов (Табл. 1). Ген *STK11* у всех пациентов с синдромом Пейтца-Егерса сразу был исследован с помощью метода NGS. Мутации, выявленные с помощью метода NGS, впоследствии были подтверждены с помощью секвенирования по методу Сэнгера.

Таблица 1. Результаты поиска герминальных мутаций у пациентов с разными наследственными формами РТК с помощью методов электрофореза и NGS.

Ген	Мутации, выявленные с помощью метода электрофореза	Мутации, выявленные с помощью метода NGS у больных без ранее обнаруженных мутаций	Мутации, выявленные с помощью обоих методов
<i>MLH1</i>	19	0	19
<i>MSH2</i>	12	2	14
<i>MSH6</i>	2	0	2
<i>APC</i>	78	4	82
<i>MutYH</i> *	8	1	9
Всего	119	7	126

Примечание: * - Исследовался с помощью метода SSCP.

Было продемонстрировано, что при использовании метода конформационно - чувствительного электрофореза частота не детектированных наследственных мутаций составила от 0 до 14% в зависимости от исследуемого гена. При использовании метода

SSCP мутация в гене *MutYH* не была обнаружена у 1 из 9 пациентов (Табл. 1). Таким образом, суммарная частота наследственных мутаций, не выявленных методом электрофореза в ПААГ, составила 5,6% (7/126).

Необходимо отметить, что все 7 мутаций, которые были обнаружены с помощью метода NGS у ранее обследованных пациентов, являлись однонуклеотидными заменами.

Кроме того, метод NGS позволил обнаружить 6 наследственных мутаций в не исследованных ранее генах (4 в гене *STK11*, по одной в гене *PMS1* и *PMS2*).

Таким образом, целесообразно применение метода NGS для исследования пациентов с клинико-анамнестическими данными о наследственных формах РТК, у которых не было выявлено мутаций с помощью метода электрофореза в ПААГ.

Разработка собственных критериев отбора российских пациентов с колоректальным раком с целью выявления синдрома Линча

Исследование пациентов с отягощенным семейным анамнезом

Поскольку Амстердамские критерии II и рекомендации Бетезда, не позволяют выявлять всех больных с синдромом Линча в связи с недостаточно высокими показателями чувствительности (22% и 82% соответственно), было принято решение разработать собственные критерии отбора российских пациентов (Цуканов А.С. и др., 2014; Цуканов А.С. и др., 2017). Также было решено выяснить насколько эффективно исследование микросателлитной нестабильности (МСН) в качестве первого этапа отбора больных. С этой целью было отобрано 23 пациента (11 женщин и 12 мужчин в возрасте от 33 до 72 лет), оперированных по поводу колоректального рака, в чьих семьях был еще один или более случаев РТК. У всех больных проводился поиск наследственных мутаций в генах *MLH1*, *MSH2* и *MSH6*, а также выполнялось исследование МСН в образце опухоли.

В результате исследования выяснилось, что возраст 5 из 6 пациентов, с установленным синдромом Линча (с помощью выявленной мутации), не превышает 43 лет (Рис. 3). При анализе родословной единственной пациентки с синдромом Линча, у которой РТК был диагностирован в возрасте 50 лет, установлено, что в ее семье было 4 случая РТК у ближайших родственников в возрасте до 43 лет. При этом даже с учетом данной больной чувствительность возраста возникновения рака до 43 лет, как критерия отбора составила 83,3%, а специфичность 82,4% ($p=0,0002$; площадь под ROC-кривой 0,83).

Кроме того, установлено, что вероятность обнаружения синдрома Линча у пациента с РТК зависит от количества родственников в его семье, у которых также имелись злокачественные новообразования. Ни у одного из 11 больных, у которых в семье встретился единственный пораженный родственник, синдром Линча не обнаружен. При этом, в 12 семьях, где было 2 и более родственников со злокачественными опухолями обнаружено 6 герминальных мутаций. Данное различие статистически значимо ($p<0,0001$). Более того, при внимательном исследовании первой группы из 11 пациентов, выяснилось, что РТК у их родственников был диагностирован в возрасте от 50 до 70 лет. Таким образом, пациентов этой группы с высокой вероятностью можно отнести к больным семейным колоректальным раком X типа, поскольку именно для данного синдрома характерны: семейная отягощенность случаями РТК, возникающего в возрасте после 50 лет; отсутствие наследственных мутаций в генах системы репарации ДНК; низкий риск развития рака в других органах.

Возраст

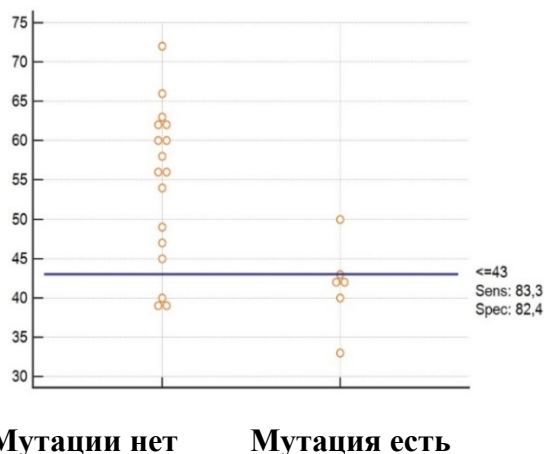


Рисунок 3. Точечный график пациентов с отягощенным семейным анамнезом, демонстрирующий зависимость наличия мутации от возраста больного.

На основании значения отрицательной прогностической значимости можно утверждать, что у всех пациентов с одним пораженным родственником мутации нет. При этом наличие у больного 2 и более родственников указывает на довольно высокую вероятность обнаружения мутации, составляющую 50% (Табл. 2). Соответственно, целесообразно введение еще одного критерия отбора пациентов основанного на анализе отягощенного семейного анамнеза: у всех пациентов с РТК, в чьих семьях встретилось еще 2 или более родственника со случаями рака необходимо проводить молекулярно-генетические исследования, направленные на диагностирование синдрома Линча. Чувствительность критерия составила 100%, специфичность 64,7% ($p < 0,0001$).

Таблица 2. Влияние количества пораженных родственников на вероятность обнаружения мутации в генах системы репарации ДНК.

Количество родствен.	Мутация		р	Чувствит.	Специфич.	ППЗ [95% ДИ]	ОПЗ [95% ДИ]
	нет	да					
1	11	0	<0,0001	100	64,7	50,0	100,0
2 и более	6	6					

Поскольку у всех 23 пациентов проводилось не только исследование наследственных мутаций в генах системы репарации ДНК, но и анализировалось наличие МСН в образце опухоли, было проведено сравнение результатов, полученных с помощью этих 2 методов. Герминальные мутации были выявлены только у больных с МСН-опухолями ($p < 0,0001$) (Табл. 3).

Таблица 3. Влияние наличия МСН на вероятность обнаружения мутации в генах MMR.

МСН	Мутация		р	Чувствит.	Специфич.	ППЗ [95% ДИ]	ОПЗ [95% ДИ]
	нет	да					
Стаб.	16	0	<0,0001	100	94	86 [47 - 98]	100
Не стаб.	1	6					

Отрицательная прогностическая значимость, равная 100% демонстрирует, что у всех больных с МСС-опухолями отсутствуют мутации в генах *MLH1*, *MSH2* и *MSH6*. При

этом положительная прогностическая значимость указывает, что вероятность обнаружения мутации у больного с наследственной формой РТК и наличием МСН в опухоли составляет 86%. Таким образом, у пациентов с РТК при подозрении синдрома Линча в качестве первого этапа целесообразно проведение теста опухолевого образца на наличие МСН, а дальнейший поиск наследственных мутаций необходимо осуществлять только в случае ее выявления.

Исследование пациентов со спорадической формой колоректального рака

Было принято решение установить эффективность предложенного критерия, учитывающего только возраст развития РТК (до 43 лет) у пациентов без отягощенного семейного анамнеза. Для этого были отобраны 12 пациентов с колоректальным раком в возрасте моложе 43 лет и 44 больных в возрасте старше 43 лет. В качестве первого этапа проводился поиск МСН в опухоли, а гены системы репарации исследовались только в случае ее обнаружения. МСН-опухоли выявлены у 5 из 12 пациентов до 43 лет и у 6 из 44 больных старше 43 лет ($p=0,045$). Дальнейший анализ наследственных мутаций показал, что они встретились только у трех пациентов в возрасте до 43 лет ($p=0,008$). Таким образом, исследование, проведенное у пациентов со спорадической формой РТК, подтвердило возможность внедрения возраста развития РТК до 43 лет у больных, в качестве критерия, который позволяет с высокой эффективностью отбирать пациентов с синдромом Линча. Чувствительность применения данного критерия у пациентов со спорадической формой колоректального рака составила 100%, а специфичность – 83% ($p<0,0001$; площадь под ROC-кривой 0,9).

Исследование объединенной выборки пациентов с колоректальным раком

При сравнении площадей двух ROC-кривых, демонстрирующих возраст развития РТК при синдроме Линча, у больных с наследственной и спорадической формой РТК статистически значимых различий выявлено не было ($p=0,7$), что позволило объединить две данные выборки пациентов. Был построен точечный график для объединенной выборки (Рис. 4).

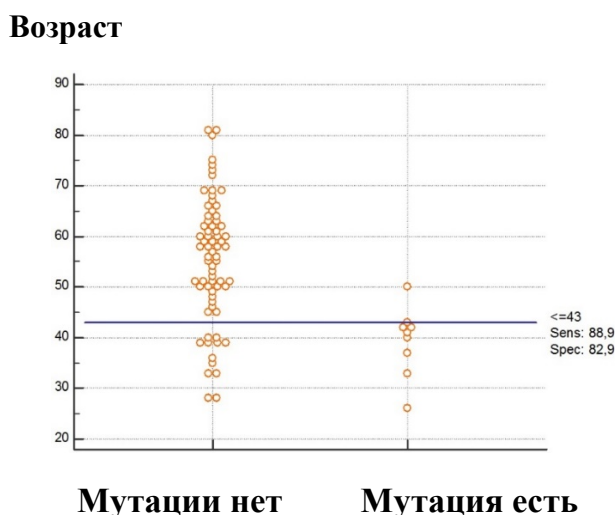


Рисунок 4. Точечный график пациентов, демонстрирующий зависимость наличия мутации от возраста больного без учета семейного анамнеза.

В результате был продемонстрирован максимальный возраст развития РТК у пациентов с синдромом Линча вне зависимости от наличия отягощенного семейного

анамнеза, который составил 43 года. Соответственно, предложен новый независимый прогностический критерий: у всех пациентов, у которых РТК развился в возрасте до 43 лет необходимо выполнение молекулярно-генетических исследований, направленных на выявление синдрома Линча. Чувствительность данного критерия составила 88,9%, а специфичность 82,9% ($p < 0,0001$; площадь под ROC-кривой 0,86).

Таким образом, исследование, проведенное у пациентов с наличием отягощенного семейного анамнеза, а также у больных со спорадической формой РТК позволило разработать и внедрить собственные критерии для отбора пациентов с синдромом Линча, чьи показатели чувствительности превысили таковые для предложенных ранее:

У всех пациентов с РТК, который развился в возрасте до 43 лет, необходимо проведение молекулярно-генетического исследования. Чувствительность критерия составила 88,9%, специфичность 82,9% ($p < 0,0001$).

У всех пациентов с РТК, в чьих семьях встретилось еще 2 или более родственника со злокачественными новообразованиями необходимо выполнение молекулярно-генетического исследования. Чувствительность критерия составила 100%, специфичность 64,7% ($p < 0,0001$).

В качестве первого этапа молекулярно-генетического исследования, направленного на поиск пациентов с синдромом Линча, необходимо выполнять анализ микросателлитной нестабильности в образце опухоли больного, а поиск герминальных мутаций в генах системы репарации ДНК осуществлять только в случае ее обнаружения.

Исследование пациентов с колоректальным раком, отобранных с помощью предложенных критериев поиска

Всего исследовали 92 пациента (44 мужчины и 48 женщин) с РТК, возраст которых был менее 43 лет и/или в чьих семьях встретилось еще 2 или более пораженных родственников. Первым этапом проводилось исследование МСН в образце опухоли больных. В результате МСН-опухоли были выявлены у 42 человек (45,7%). В дальнейшем у всех 42 пациентов был проведен поиск наследственных мутаций в генах системы репарации ДНК. Наследственные мутации выявлены у 28 больных (66,7%). Таким образом, мутации в генах системы репарации ДНК суммарно выявлены у 37 человек, что позволило установить у них синдром Линча.

Частота и спектр наследственных мутаций в генах системы репарации ДНК

Наследственные мутации у пациентов с синдромом Линча были выявлены в генах *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* и *PMS2* (Рис. 5). Наиболее часто (89,2%) герминальные мутации встретились в генах *MLH1* и *MSH2*. В других европейских популяциях частота мутаций в этих 2 генах у пациентов с синдромом Линча также составляет от 70 до 90% (Weissman S. et al., 2012; Egoavil C. et al., 2013). При этом у большинства европейцев мутации чаще встречаются в гене *MSH2*, однако в финской популяции мутации в 83% случаев обнаруживаются в гене *MLH1* (Pérez-Cabornero L. et al., 2013). В проведенном исследовании мутации в гене *MLH1* также встретились больше, чем у половины пациентов (19/37; 51,4%) (Рис. 5).

Среди найденных герминальных вариантов в гене *MLH1* было 7 делеций (с.444_450delT, с.947delT, с.2073_2074delAT и с.1852_1854del - у 4 больных), 2 инсерции (с.445dupC, с.1520dupT), 2 нонсенс-мутации (с.298C>T, с.1225C>T), 4 мутации сайта сплайсинга (с.546-2A>G, с.677G>T, с.1896+1G>C, с.2103+1G>C) и 4 миссенс-мутации (с.299G>C, с.2038T>C и с.350C>T - у 2 больных).

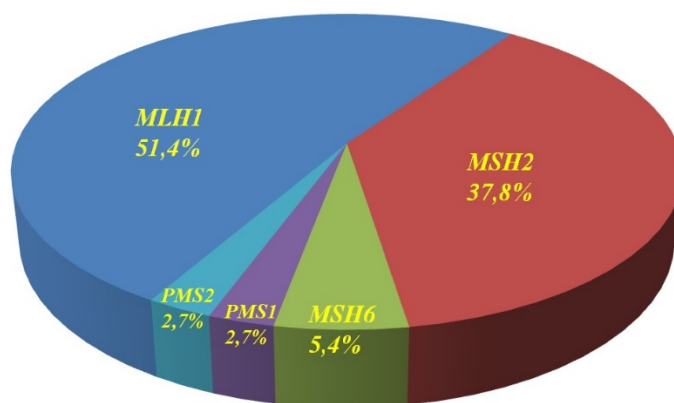


Рисунок 5. Частота мутаций в генах системы репарации у пациентов с синдромом Линча.

Из семи выявленных делеций три не были кратны 3 нуклеотидам и приводили к появлению преждевременного стоп-кодона, соответственно являясь истинно патогенными. При этом все эти мутации: с.444_450del7 (p.Gln149ArgfsX12), с.947delT и с.2073_2074delAT (p.Ser692X) не встретились в базах данных InSiGHT (www.insight-group.org) и Human Gene Mutation Database (HGMD®) и описываются впервые. Вариант с.1852_1854del (p.Lys618del), приводящий к выпадению 3 нуклеотидов встретился у четверых неродственных пациентов. Данный вариант описан как патогенный в базе данных InSiGHT (www.insight-group.org) уже более 130 раз у пациентов из разных популяций.

Две найденные инсерции с.445dupC (p.Gln149ProfsX23) и с.1520dupT (p.Leu507PhefsX8) представляют собой вставку одного нуклеотида и приводят к появлению преждевременного стоп-кодона. Вариант с.1520dupT (p.Leu507PhefsX8) уже был описан как патогенный ранее. Мутация с.445dupC (p.Gln149ProfsX23) не встретилась в базах данных InSiGHT (www.insight-group.org) и Human Gene Mutation Database (HGMD®) и описывается впервые.

Нонсенс-мутации с.298C>T (p.Arg100X) и с.1225C>T (p.Gln409X) уже были описаны в базах данных InSiGHT (www.insight-group.org) и Human Gene Mutation Database (HGMD®) как патогенные.

Из 4 выявленных мутаций сайта сплайсинга три (с.546-2A>G, с.1896+1G>C и с.2103+1G>C) располагались не далее, чем в 2 нуклеотидах от экзона. Две из них (с.546-2A>G и с.2103+1G>C), как патогенные были описаны ранее в базе данных InSiGHT (www.insight-group.org). Кроме того, патогенное значение варианта с.677G>T (p.Gln197ArgfsX8) также было продемонстрировано ранее (Xiong H.Y. et al., 2015). Вариант с.1896+1G>C описывается впервые. При этом на его патогенное значение указывает несколько факторов. Во-первых, в этом же месте локализовано два варианта, описанных как патогенные в базе данных Human Gene Mutation Database (HGMD®) (с.1896+1G>A и с.1896+1G>T). Во-вторых, данный вариант был обнаружен не только у пациентки, но и у ее пораженной родственницы, а также не встретился у двух здоровых членов семьи. Кроме того, для выяснения функциональной значимости данного варианта была использована программа предсказания сайтов сплайсинга NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>). В последовательности ДНК с вариантом с.1896+1G программа с вероятностью равной 0,71 предсказала появление нормального донорного сайта сплайсинга. При этом для нуклеотидной последовательности с вариантом с.1896+1C программа вообще не выявила вероятность появления нормального донорного сайта сплайсинга. Наконец, на патогенное значение варианта с.1896+1G>C указывает

наличие МСН в образце опухоли больного. Таким образом, все описанные факты позволяют с высокой долей вероятности рассматривать функциональное значение варианта с.1896+1G как патогенное.

В гене *MLH1* выявлено 4 миссенс-мутации. Патогенное значение варианта с.299G>C (p.Arg100Pro) было продемонстрировано ранее (Thompson B.A. et al., 2013). Мутация с.350C>T (p.Thr117Met), встретившаяся у 2 неродственных пациентов, описана как патогенная в базе данных InSiGHT (www.insight-group.org) более 110 раз у больных из разных популяций. Наконец, функциональное значение варианта с.2038T>C (p.Cys680Arg), как патогенного также было продемонстрировано ранее (Dominguez-Valentin M. et al., 2014). Интересным представляется тот факт, что миссенс-мутации в гене *MLH1* встретились только у 4 из 19 пациентов (21,1%), в то время как у других европейцев их частота может достигать 40% (Plazzer J.P. et al., 2013). При этом известно, что именно миссенс-мутации, а также интронные варианты, расположенные более, чем в 3 нуклеотидах от экзона, представляют наибольшую трудность в плане определения функционального значения. Таким образом, доля герминальных мутаций, приводящих к появлению укороченного белка, и, соответственно, являющихся патогенными, у проанализированных больных составила почти 79% (15/19). Столь высокая частота однозначно патогенных мутаций позволяет существенно облегчить выяснение функционального значения впервые выявленных вариантов в гене *MLH1* у российских пациентов. Также необходимо отметить, что среди пяти впервые описанных герминальных мутаций у обследованных больных миссенс-вариантов не встретилось.

В гене *MSH2* было выявлено 14 наследственных мутаций, среди которых встретилось 5 нонсенс-мутаций (с.1174A>T, с.1288A>T, с.1699A>T, с.1968C>A, с.1968C>G), 3 делеции (с.345_348del4, с.388_389delCA, с.571_573delCTC), 3 миссенс-мутации (с.2086C>T, с.989T>C – у 2 пациентов), 2 мутации сайта сплайсинга (с.942+3A>T– у 2 пациентов) и 1 вставка (с.2407dupA).

Из 5 выявленных нонсенс-мутаций 4 были описаны ранее в базах данных InSiGHT (www.insight-group.org) и Human Gene Mutation Database (HGMD®). Вариант с.1174A>T (p.Lys392X) описывается впервые. Данный вариант приводит к появлению укороченного белка, соответственно являясь патогенным.

Среди 3 обнаруженных делеций 2 (с.345_348del4 и с.388_389delCA) не были кратны 3 нуклеотидам и приводили к появлению преждевременного стоп-кодона. Интересным представляется тот факт, что для варианта с.388_389delCA в 2013 году был продемонстрирован «эффект основателя» в Португалии (Pinheiro M. et al., 2013). Мутация с.345_348del4 (p.Asp116GlyfsX57) описывается впервые. Патогенное значение варианта с.571_573delCTC (p.Leu191del) было установлено ранее (Thompson B.A. et al., 2013).

Миссенс-мутация с.989T>C (p.Leu330Pro), встретившаяся у 2 обследованных пациентов, была описана ранее у больных колоректальным раком из разных популяций в базах данных InSiGHT (www.insight-group.org) и Human Gene Mutation Database (HGMD®). Вариант с.2086C>T (p.Pro696Ser) описывается впервые. На патогенное значение данного варианта указывают несколько факторов. Во-первых, в данном кодоне уже выявлена миссенс-мутация с.2087C>T (p.P696L), для которой было продемонстрировано патогенное функциональное значение (Thompson B. et al., 2014). Во-вторых, функциональное значение данного варианта было исследовано с помощью программы «Mutation taster» (<http://www.mutationtaster.org>), которая с высокой вероятностью (0,99999), определила значение данного варианта, как патогенное. Наконец, на патогенное значение данного варианта указывает наличие МСН в образце опухоли

обследованного пациента. Таким образом, миссенс-мутацию с.2087C>T (р.Р696L) в гене с высокой вероятностью можно отнести к патогенным.

Патогенная мутация сайта сплайсинга с.942+3A>T (р.Val265_Gln314del), выявленная у 2 обследованных больных, была описана уже более 160 раз в базе данных InSiGHT (www.insight-group.org).

Инсерция с.2407dupA (р.Thr803AsnfsX6) ранее не была обнаружена и описывается впервые. Данная мутация приводит к образованию преждевременного стоп-кодона, соответственно являясь патогенной.

Таким образом, у 3 из 14 (21,4%) пациентов в гене *MSH2* выявлены миссенс-мутации, при этом в других европейских популяциях их доля может достигать 31%. Выяснение функциональной значимости было проведено для одного ранее не описанного миссенс-варианта с.2087C>T (р.Р696L). Соответственно, 11 мутаций (78,6%) приводили к появлению укороченного белка и не требовали подтверждения патогенного значения. Частота ранее не описанных мутаций составила 28,6% (4/14).

В гене *MSH6* выявлены 2 наследственные мутации, среди которых миссенс-мутация с.2234T>A (р.Ile745Asn), а также нонсенс-мутация с.3577G>T (р.Glu1193X). Патогенное значение миссенс-мутации с.2234T>A (р.Ile745Asn) было продемонстрировано ранее (Bonadona V. et al., 2011). Стоит отметить, что у больных из разных европейских популяций миссенс-мутации в гене *MSH6* с частотой 49% занимают первое место среди всех патогенных вариантов. Нонсенс-мутация с.3577G>T описывается впервые. Данный вариант приводит к возникновению укороченного белка, соответственно являясь патогенным.

В гене *PMS2* выявлена одна мутация сайта сплайсинга с.1144+1G>A. Данный наследственный вариант описывается впервые, о его патогенности говорит тот факт, что MCH была выявлена в образцах 2 метахронных опухолей пациента.

В гене *PMS1* выявлена ранее не описанная мутация с.829C>T (р.R277X), которая приводит к появлению укороченного белка, соответственно являясь истинно патогенной. Стоит отметить, что к настоящему моменту в базе данных Human Gene Mutation Database (HGMD®) описано только 11 наследственных мутаций, из которых только одна является нонсенс-мутацией. При этом в базе данных InSiGHT (www.insight-group.org) мутаций в гене *PMS1* не описано.

Таким образом, частота наследственных мутаций в генах *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* и *PMS2* составила 51,4%, 37,8%, 5,4%, 2,7% и 2,7%, соответственно. Было найдено 4 повторяющихся мутации (2 в гене *MLH1*, 2 в гене *MSH2*). Частота ранее не описанных герминальных мутаций составила 32,4% (12/37). Полученные данные указывают на целесообразность начинать ДНК-диагностику у российских больных с подозрением на синдром Линча с гена *MLH1*. Кроме того, крайне важно исследовать все кодирующие экзоны генов системы репарации ДНК.

Отношение генотип-фенотип у пациентов с герминальными мутациями в генах системы репарации

Среди 37 пробандов с генетически подтвержденным диагнозом синдрома Линча у 27 человек имелись родственники со злокачественными новообразованиями различных органов, а в 10 наблюдениях не было членов семьи, страдавших раком (Табл. 4).

Из 19 пациентов с мутацией в гене *MLH1* у 14 человек имелись пораженные родственники, еще 5 пациентов были обследованы, поскольку первый РТК у них развился в возрасте до 43 лет. У 19 пробандов и их родственников выявлены злокачественные

новообразования в 6 различных органах: 72 случая РТК, 11 - рака желудка, 3 - рака тела матки, 2 - рака молочной железы, 2 - опухолей головного мозга и 1 - рака сальных желез.

Таблица 4. Злокачественные опухоли у пробандов с синдромом Линча и в их семьях.

Ген	Мутация	Случаи рака у пробанда	Случаи рака у родственников
<i>MLH1</i>	c.298C>T	РТК	6 РТК, РТМ, РЖ, ОГМ
	c.546-2A>G	2 РТК	3 РТК
	c.1896+1G>C	3 РТК	2 РТК, 3 РЖ, РМЖ
	c.299G>C	РТК	4 РТК
	c.2038T>C	3 РТК	-
	c.2073_2074delAT	4 РТК, РЖ	2 РТК
	c.1225C>T	2 РТК, РТМ	2 РТК
	c.677G>T	2 РТК	РТК
	c.350C>T	РТК	РТК
	c.350C>T	РТК	3 РТК, РЖ, РСЖ
	c.1520dupT	РТК	-
	c.445dupC	РТК	-
	c.1852_1854del	2 РТК	-
	c.1852_1854del	2 РТК	5 РТК, 2 РЖ, ОГМ
	c.1852_1854del	3 РТК	2 РТК, РЖ, РМЖ
	c.1852_1854del	РТК, РТМ	3 РТК, 2 РЖ
	c.444_450del7	РТК	-
c.947delT	РТК	РТК	
c.2103+1G>C	РТК	4 РТК	
<i>MSH2</i>	c.1968C>A	2 РТК	2 РТК
	c.1174A>T	4 РТК, РТМ	РЯ, РЖ
	c.345_348del4	2 РТК, РТМ	2 РТК, РМочет., РМЖ, РПоч.
	c.1968C>G	2 РТК	РТМ
	c.2407dupA	РТК	-
	c.1288A>T	2 РТК	5 РТК, РТМ, 5 РЖ
	c.2086C>T	РТК	-
	c.989T>C	3 РТК, РТМ	РТМ, РПЖ
	c.989T>C	2 РТК, РТМ	РТК
	c.571_573delCTC	РТК	РТК
	c.942+3A>T	РТК, РПр.Ж, РМочет.	2 РТК, РТМ, РЖ, РМочет.
	c.942+3A>T	РТК, РТМ	РТК, РМП
	c.1699A>T	РТК	-
c.388_389delCA	2 РТК	3 РТК, РМП	
<i>MSH6</i>	c.2234T>A	РТК	-
	c.3577G>T	РТК	-
<i>PMS2</i>	c.1144+1G>A	РТК, РТМ, РМЖ	РТК, РЖ
<i>PMS1</i>	c.829C>T	2 РТК, РЩЖ	РТК

Примечание: РТМ – рак тела матки, РЖ – рак желудка, РСЖ – рак сальных желез, ОГМ – опухоль головного мозга, РМЖ – рак молочной железы, РЯ – рак яичников, Рмочет. – рак мочеточника, РПоч. – рак почки, РПЖ – рак поджелудочной железы, РМП – рак мочевого пузыря, РЩЖ – рак щитовидной железы, РПр.Ж – рак предстательной железы.

Обе семьи, в которых встретились случаи опухолей головного мозга, с высокой долей вероятности необходимо отнести к редкому варианту синдрома Линча – синдрому Тюрко. При этом важно подчеркнуть, что у пробандов из этих семей встретились герминальные мутации различающиеся как по типу, так и по локализации в первичной структуре ДНК гена *MLH1*: нонсенс-мутация с.298С>Т (p.Arg100X) и делеция с.1852_1854del (p.Lys618del). Несомненный интерес представляет семья пробанда с миссенс-мутацией с.350С>Т (p.Thr117Met), в которой встретился рак сальных желез, поскольку ее необходимо отнести к другому редкому варианту синдрома Линча – синдрому Мюир-Торре.

Стоит отметить, что случаи рака желудка встретились в половине семей, где имелась наследственная отягощенность злокачественными новообразованиями, в то время, как согласно данным других европейских авторов, данная патология располагается лишь на шестом месте по частоте встречаемости при синдроме Линча (Giardiello F. et al., 2014). Рак желудка у обследованных пациентов и их родственников встречался достоверно чаще, чем расположившийся на третьем месте рак тела матки ($p < 0,05$). При этом рак желудка встречался в семьях пробандов, имеющих практически все типы мутаций в гене *MLH1*: миссенс-мутации, нонсенс-мутации, делеции и мутации сайта сплайсинга. Интересным представляется тот факт, что у пробандов, в чьих семьях встретился рак желудка, мутации располагались по краям нуклеотидной последовательности гена *MLH1* (до 120 кодона - 2 мутации, после 616 кодона – 9 мутаций), однако это различие не было статистически значимым по сравнению с частотой мутаций в участке между кодонами 120-615 у больных РТК или раком эндометрия ($p = 0,1$).

Таким образом, суммарно у 19 пробандов с мутациями в гене *MLH1* и их родственников встретился 91 случай злокачественных новообразований, соответственно, в среднем на семью пришлось почти 5 случаев рака. Наиболее часто в семьях исследованных пациентов встретился колоректальный рак - 79,1%, на втором месте (12,1%) расположился рак желудка. Среди обследованных семей встретилось 2 случая синдрома Тюрко, а также один случай синдрома Мюир-Торре. При этом какой-либо достоверной корреляции между типом наследственной мутации, а также ее локализацией в первичной структуре гена *MLH1* и раком определенного органа не выявлено.

У 11 из 14 пробандов с мутацией в гене *MSH2* имелся отягощенный анамнез, оставшиеся 3 человека были обследованы на предмет поиска синдрома Линча, поскольку у них развился РТК в возрасте до 43 лет. Спектр злокачественных новообразований в семьях с мутацией в гене *MSH2* был значительно разнообразнее, чем в семьях с мутациями в гене *MLH1*. Всего у пациентов и их пораженных родственников встретилось 42 случая РТК, 9 - рака тела матки, 7 - рака желудка, 3 – рака мочеочника, 2 - рака мочевого пузыря, по одному случаю рака молочной железы, яичников, предстательной железы, почки и поджелудочной железы.

При анализе локализации злокачественных новообразований в первую очередь обращает на себя внимание, тот факт, что второе место по частоте встречаемости после РТК у пациентов и их родственников занимает рак тела матки, который встретился в 8 семьях. При этом данное отличие по сравнению с семьями, в которых были выявлены герминальные мутации в гене *MLH1*, статистически значимо ($p = 0,03$). Рак тела матки встретился у пробандов с различными типами мутаций, которые находились в разных экзонах гена *MSH2*. На третьем месте располагался рак желудка, однако достоверных различий с группой семей, в которой встретились наследственные мутации в гене *MLH1* не было ($p = 0,8$). Стоит отметить существенное количество раков в органах

мочевыделительной системы у пациентов и их родственников: 3 случая рака мочеочника, 2 – мочевого пузыря, 1 – рак почки, что статистически значимо различается с данными полученными в выборке семей с наследственными мутациями гена *MLH1* ($p=0,005$). Кроме того, у больных встретились единичные случаи злокачественных новообразований яичников, предстательной железы и поджелудочной железы, хотя в данном случае статистически значимых различий с группой семей, имеющих мутацию в гене *MLH1*, не было ($p=0,07$).

При этом среди обследованных семей не встретилось редких вариантов синдрома Линча – синдрома Тюрко и синдрома Мюир-Торре. Это тем более удивительно, поскольку известно, что синдром Мюир-Торре наиболее часто встречается в семьях, где была обнаружена мутация с.942+3A>T в гене *MSH2* (South C. et al., 2008). Вариант с.942+3A>T был выявлен у 2 обследованных пациентов, в чьих семьях имелось довольно существенное количество злокачественных новообразований, однако рака сальных желез не встретилось.

Таким образом, суммарно у 14 пробандов с наследственными мутациями в гене *MSH2* и их родственников встретилось 68 случаев злокачественных новообразований (в среднем 5 случаев рака в семье). Наиболее часто (61,8%) встретились случаи РТК, рака тела матки (13,2%), рака желудка (10,3%), а также опухоли органов мочевыделительной системы (8,8%). Рак тела матки и опухоли органов мочевыделительной системы встречались существенно чаще в семьях больных с мутацией в гене *MSH2*, по сравнению с семьями больных, имеющих мутацию в гене *MLH1* ($p=0,03$; $p=0,005$). Какой-либо достоверной корреляции между типом наследственной мутации, а также ее локализацией в нуклеотидной последовательности гена *MSH2* и раком определенного органа не выявлено.

У обоих пациентов с наследственными мутациями в гене *MSH6* не отягощенного семейного анамнеза, а молекулярно-генетическое исследование у проводилось, поскольку возраст развития РТК составил 33 и 41 год, соответственно. Таким образом, малое количество пациентов с наследственной мутацией в гене *MSH6*, а также отсутствие в их семье пораженных родственников не позволяет определить какие-либо генетико-фенотипические корреляции относительно герминальных мутаций в данном гене.

В гене *PMS2* у одной пациентки обнаружена мутация с.1144+1G>A. У больной было несколько случаев злокачественных опухолей: РТК, рак тела матки и рак молочной железы, а в семье - случаи рака желудка и толстой кишки. При этом интересным представляется тот факт, что одна мутация в этом же участке гена *PMS2* с.1144+2T>A была описана ранее в семье только со случаями РТК, а другая - с.1144+2T>G встретилась в семье, где были случаи только рака молочной железы и/или яичников (Castéra L, et al., 2014; Xiong H. et al., 2015).

Мутация с.829C>T (p.R277X) в гене *PMS1* встретилась у одной больной. Интересным представляется тот факт, что помимо 2 случаев колоректального рака, у данной пациентки развился рак щитовидной железы, который до этого не был обнаружен ни у одного пациента и их родственников, имеющих мутацию в других генах системы репарации ДНК ($p=0,02$).

Таким образом, суммарно в 37 семьях встретилось 170 случаев рака (в среднем более 4 случаев на семью). Наиболее часто у больных был диагностирован РТК – 71,2% (121/170). На втором месте находился рак желудка 11,2% (19/170), далее следовали рак тела матки – 7,7% (13/170), опухоли мочевыделительной системы - 3,5% (6/170), рак молочной железы – 2,4% (4/170), опухоли головного мозга 1,2% (2/170) и другие. Стоит

отметить, что злокачественные новообразования желудка встретились с высокой частотой как в семьях с наследственными мутациями в гене *MLH1*, так и у больных с мутациями в гене *MSH2*, в то время как опухоли тела матки достоверно чаще обнаруживались в семьях пробандов с мутациями в гене *MSH2* ($p=0,03$). Случаи рака органов мочевыделительной системы выявлены только в семьях с мутациями в гене *MSH2* ($p=0,004$), а рак щитовидной железы - у пробанда с герминальной мутацией в гене *PMS1*.

Полученные данные позволяют предложить собственные рекомендации клинического мониторинга для носителей мутаций в генах системы репарации ДНК.

У всех носителей мутации в любом из генов системы репарации ДНК необходимо проведение ежегодного эндоскопического обследования толстой кишки и ЭГДС, начиная с возраста 22 и 27 лет, соответственно. Кроме того, всем женщинам показано также ежегодное выполнение УЗИ матки с придатками и проведение маммографии, начиная с возраста 27 и 30 лет, соответственно.

У всех носителей мутации в гене *MSH2* необходимо проведение ежегодного обследования органов мочевыделительной системы и выполнение анализа мочи, начиная с возраста 32 лет.

Носителям мутации в гене *MLH1*, у которых родственники страдали опухолями головного мозга, показано ежегодное выполнение МРТ головного мозга, начиная с 22 лет.

Носителям мутации в гене *PMS1* показано ежегодное обследование щитовидной железы, начиная с возраста 40 лет.

Клинические особенности течения онкологических заболеваний у пробандов с синдромом Линча

Для выяснения клинических особенностей течения онкологических заболеваний у пациентов с синдромом Линча были проанализированы такие факторы, как возраст возникновения рака, локализация, стадия, степень дифференцировки и наличие метастазов (Цуканов А.С. и др., 2015). Все факторы анализировались по отношению к первому РТК. Однако удалось получить эту информацию не у всех пациентов, поскольку некоторые больные были оперированы в других клинических учреждениях и не смогли предоставить необходимую медицинскую документацию. Таким образом, клинические характеристики первого колоректального рака были проанализированы у 32 больных (Табл. 5). Всего у 32 пациентов встретилось 34 первичных колоректальных опухоли, поскольку у двух больных были выявлены по 2 синхронные опухоли в толстой кишке. При этом первым онкологическим заболеванием у 6 пациенток был рак тела матки, у остальных больных – РТК. Средний возраст возникновения первого злокачественного новообразования, независимо от локализации (РТК или рак тела матки), у обследованных пациентов составил 36,5 лет. Стоит отметить, что по данным мультицентрового исследования европейских пациентов, в которое было включено 537 семей из 40 центров, средний возраст развития первого рака у пациента с синдромом Линча составил 45 лет (Bonadona V. et al., 2011).

При этом у 6 человек (18,8%) случай первого РТК отмечен в возрасте от 26 до 28 лет; риск развития РТК у других европейцев в аналогичном возрасте не превышал 5%. У 4 из 6 пациенток был отмечен первый рак тела матки в возрасте от 31 до 37 лет; риск развития рака этого органа в указанном исследовании также не превышал 5% (Bonadona V. et al., 2011).

Таблица 5. Данные по злокачественным опухолям пробандов с синдромом Линча.

Первичный РТК Локализация - Возраст	Первичный РТК TNM / Гистологическое строение	Метахронные опухоли Локализация - Возраст
ПОК – 50	T4bN2M1 / НДА	-
Нисх. – 42	T2N0M0 / УДА	Восх. – 60
Восх. - 40	T4N0M0 / УДА	Сигм. – 68, ПОК – 70
Нисх. - 33	TisN0M0 is	-
Сигм. - 37	T4N0M0 / УДА	Восх. – 39, ПОК – 68
Нисх. - 43	T4N0M0 / НДА	Восх.+Слепая+Прямая+РЖ - 45
Прямая - 38	T3N1M0 / УДА	РТМ – 31, Слепая – 46
ПОК+Прямая - 43	T2N0M0 / НДА+T2N0M0 / УДА	-
ПОК – 31	T2N0M0 / НДА	-
Прямая - 41	TisN0M0 is	-
Сигм. - 27	T4N0M0 / УДА	-
Сигм. - 34	T4N1M0 ВДА	-
Сигм. - 26	T4N0M0 / НДА	Прямая – 27
Восх. - 27	T4N0M0 / НДА	ПОК – 50
Сигм. - 27	T3N0M0 / НДА	Слепая – 47, Прямая – 53
Восх. - 49	T4N0M0 / УДА	РТМ – 47
Восх. - 42	T3N0M0 / НДА	-
Прямая - 39	T2N0M0 / УДА	-
Прямая - 41	T3N0M0 / УДА	Восх. – 43
Прямая - 49	T4N0M0 / НДА	РТМ - 35, Сигм.+Сигм.+Сигм - 54
Прямая+Сигм. - 49	T2N0M0 / НДА+T1N0M0 / УДА	РТМ - 37
Сигм. - 39	T4N2M0 / УДА	ПОК – 47
Сигм. - 31	T3N0M0 / УДА	-
ПОК – 39	T4N1M0 / НДА	-
Слепая - 50	T3N0M0 / НДА	РТМ – 35, Прямая – 61, ПОК - 74
Сигм. - 28	T4N2M1 / НДА	-
ПОК – 42	T3N0M0 / НДА	РПр.Ж – 58, РМочет. – 60
Прямая – 37	T3N0M0 / УДА	-
Прямая - 26	T1N0M0 / УДА	Сигм. - 33
Сигм. - 41	T3N0M0 / УДА	-
Прямая - 33	T4N1M0 / УДА	-
ПОК – 50	T4N1M0 / НДА	РТМ – 43, РМЖ - 56

Примечание: УДА – умеренно дифференцированная аденокарцинома, НДА – низкодифференцированная аденокарцинома, ВДА – высокодифференцированная аденокарцинома, Восх. – восходящая ободочная кишка, Сигм. – сигмовидная кишка, ПОК – поперечная ободочная кишка, Нисх. – нисходящая ободочная кишка.

Анализируя локализацию первого злокачественного новообразования в толстой кишке у обследованных пациентов, стоит отметить, что в правых отделах опухоль локализовалась только в 11 (32,4%) наблюдениях, соответственно, в левых отделах рак выявлен в 23 (67,6%) случаях, из которых в 10 – в прямой кишке (Рис. 6).

Эти результаты представляются крайне актуальными, поскольку известно, что у европейских и американских пациентов с синдромом Линча в большинстве случаев (от 60 до 80%) первая опухоль располагается в проксимальных отделах толстой кишки, а именно данный аспект определяет объем оперативного вмешательства у больного. Согласно

международным рекомендациям, в случае обнаружения первой опухоли в проксимальных отделах толстой кишки больному с синдромом Линча показано выполнение колэктомии с формированием илеоректального анастомоза, а при локализации опухоли в прямой кишке необходимо рассматривать возможность выполнения колпроктэктомии, что обусловлено высоким риском развития метакронной опухоли в оставшейся части толстой кишки в случае выполнения стандартного объема хирургического вмешательства (Giardiello F. et al., 2014).

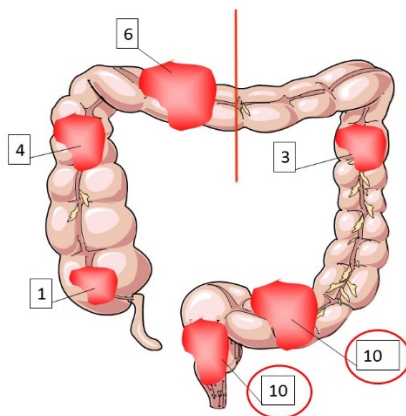


Рисунок 6. Локализация первой опухоли в толстой кишке у пациентов с синдромом Линча (цифрами указано количество опухолей).

Таким образом, локализация первой опухоли у обследованных пациентов преимущественно в дистальных отделах и, тем более, в прямой кишке демонстрирует необходимость разработки и внедрения собственной хирургической тактики у больных с синдромом Линча. С одной стороны, может быть выполнена колпроктэктомия с формированием илеостомы или тонкокишечного резервуара, а с другой – стандартный объем оперативного вмешательства с дальнейшим выполнением регулярного (не реже одного раза в 6-12 месяцев) эндоскопического обследования оставшихся отделов толстой кишки.

С целью решения вопроса об объеме оперативного вмешательства при развитии первого РТК у пациентов с установленным синдромом Линча, крайне важным представляется анализ такой характеристики, как частота развития метакронной опухоли в определенный временной период у больных, которым выполнялся стандартный объем оперативного вмешательства. Так, согласно данным некоторых исследователей, риск развития метакронной опухоли в оставшихся отделах толстой кишки составляет 16%, 41% и 62% через 10, 20 и 30 лет после выполнения стандартного объема хирургического вмешательства по поводу первого РТК (Parry S. et al., 2011). Среди 32 обследованных пациентов вторые первичные опухоли в оставшихся отделах толстой кишки встретились у 9 человек, а третьи первичные опухоли – еще у 4 больных, что может быть обусловлено недостаточным периодом наблюдения за другими пациентами. Обращает на себя внимание тот аспект, что вторая опухоль в оставшихся отделах толстой кишки появилась в первые 10 лет после проведенного оперативного вмешательства у 8 из 13 (61,5%) человек (у двух из них было обнаружено сразу по 3 синхронные опухоли), у 3 пациентов в течение 20 лет и у 2 больных в течение 30 лет. При этом у 4 пациентов также было диагностировано третье злокачественное новообразование в толстой кишке через 2, 6, 13 и 29 лет после второй опухоли, соответственно. Полученные данные демонстрируют, что в 10 из 17 (59%) случаев метакронные опухоли в оставшихся отделах толстой кишки развиваются уже в первые 10 лет после выполнения хирургического вмешательства в

стандартном объеме, что необходимо учитывать при определении тактики оперативного вмешательства и последующего клинического мониторинга пациента.

Анализ характера распространенности первой опухоли толстой кишки продемонстрировал, что у большинства (44,1%) пациентов с синдромом Линча встретилась стадия T4, у 26,5% – T3, у 17,6% – T2, у 5,9% - T1 и в 5,9% наблюдений выявлена Tis. Метастазы в региональные лимфоузлы обнаружены у 8 пациентов, из которых у 2 были выявлены еще и метастазы в печень. Результаты, демонстрирующие в большинстве случаев местно-распространенный характер первой опухоли толстой кишки, а также невысокую частоту метастазов в лимфоузлы и другие органы, согласуются с данными других европейских исследований (Thiel A. et al., 2013). При этом крайне важным представляется тот факт, что среди 13 человек, у которых в оставшихся отделах толстой кишки были диагностированы метакронные опухоли, метастазы в лимфоузлы были выявлены у 5 (38%) больных, однако случаев отдаленного метастазирования у них не обнаружено. Более того, из 4 пациентов, у которых был диагностирован 3 случая колоректального рака, только у 1 имелось метастазирование в лимфоузлы, а случаев отдаленного метастазирования не выявлено. Данные по отсутствию отдаленного метастазирования у пациентов с метакронными опухолями толстой кишки демонстрируют целесообразность адекватного клинического мониторинга, что позволяет рассматривать его в качестве возможной альтернативы выполнения расширенного объема оперативного вмешательства у такого рода больных.

Среди 34 первичных колоректальных опухолей низкая степень дифференцировки определена в 15 случаях, умеренная степень дифференцировки – в 16 случаях, в 2 случаях был выявлен рак *in situ* и в одном случае - высокодифференцированная аденокарцинома. Данные по высокой частоте встречаемости низкодифференцированных аденокарцином у пациентов с синдромом Линча согласуются с результатами зарубежных исследований (Kastrinos F., Syngal S., 2011).

Таким образом, клинические данные обследованных больных с синдромом Линча продемонстрировали ряд особенностей, в сравнении с результатами, полученными при анализе других европейских и североамериканских пациентов. В первую очередь необходимо отметить более ранний средний возраст развития первого злокачественного новообразования (36,5 и 45 лет, соответственно). Кроме того, обращает на себя внимание высокая частота (67,6% и 30%, соответственно) встречаемости первой опухоли в дистальных отделах толстой кишки, что диктует целесообразность разработки собственных рекомендаций по объему хирургического вмешательства и проведению последующего клинического мониторинга. При этом с одной стороны показано, что у российских больных более половины случаев метакронных опухолей в оставшихся отделах толстой кишки диагностируется уже в первые 10 лет после выполнения стандартного объема оперативного вмешательства, а с другой - продемонстрировано отсутствие отдаленного метастазирования при повторных опухолях, что может быть обусловлено проведением адекватного клинического мониторинга.

Частота и спектр наследственных мутаций в гене APC у пациентов с наличием более 100 аденоматозных полипов

Молекулярно-генетическое исследование гена APC проведено у 108 пациентов (65 женщин и 43 мужчины в возрасте от 8 до 45 лет, средний возраст – 28,8 лет), у которых при выполнении эндоскопического обследования в толстой кишке было обнаружено более 100 аденоматозных полипов, что позволило установить у них диагноз «Семейный

аденоматоз толстой кишки». У 49 больных на фоне данного заболевания был диагностирован РТК. У 77 человек прослеживалсяотягощенный семейный анамнез.

Патогенные наследственные мутации в гене *APC* были выявлены у 78 из 108 (72,2%) пациентов (Табл. 6), что позволяет говорить об описываемой нами частоте герминальных мутаций как об одной из наиболее высоких, поскольку известно, что в работах других европейских исследователей встречаемость мутаций в этом гене составляет от 50% до 75% (Nieuwenhuis M., Vasen H., 2007). При этом в наиболее масштабном исследовании, проведенном в 2013 году в выборке американских пациентов, включающей 1591 случай семейного аденоматоза толстой кишки, в гене *APC* было выявлено только 411 патогенных и 20 вероятно патогенных мутаций (суммарная частота составила 27,1%), а также 15 вариантов неясного клинического значения (Kerr S. et al., 2013). Стоит отметить, что в исследованной нами выборке также встретилось несколько вариантов в гене *APC*, для которых было проведено выяснение функциональной значимости.

Таблица 6. Данные о мутациях в гене *APC*, выявленных у пациентов с САТК.

кДНК	Белок	Тип мутации	Случаи	Описана ранее
c.423-6A>G		Мутация сайта сплайсинга	1	нет
c.637C>T	p.Arg213X	Нонсенс-мутация	5	да
c.646-1G>A		Мутация сайта сплайсинга	1	да
c.646C>T	p.Arg216X	Нонсенс-мутация	3	да
c.694C>T	p.Arg232X	Нонсенс-мутация	2	да
c.778C>T	p.Gln260X	Нонсенс-мутация	1	да
c.832C>T	p.Gln278X	Нонсенс-мутация	1	да
c.866_869delCCAG	p.Ala289ValfsX3	Делеция	1	нет
c.1312+3A>C		Мутация сайта сплайсинга	1	да
c.1332dupT	p.Gln445SerfsX15	Инсерция	1	нет
c.1370C>G	p.Ser457X	Нонсенс-мутация	1	да
c.1438C>T	p.Gln480X	Нонсенс-мутация	1	да
c.1495C>T	p.Arg499X	Нонсенс-мутация	1	да
c.1548+1G>A		Мутация сайта сплайсинга	1	да
c.1659G>A	p.Trp553X	Нонсенс-мутация	1	да
c.1690C>T	p.Arg564X	Нонсенс-мутация	1	да
c.1767_1777del11	p.Leu589LeufsX9	Делеция	1	нет
c.1863_1866delTTAC	p.Tyr622GlyfsX8	Делеция	1	да
c.1875_1878delGACA	p.Asn627LeufsX2	Делеция	1	да
c.1958G>C	p.Arg653Thr	Мутация сайта сплайсинга	1	да
c.1987C>T	p.Gln663X	Нонсенс-мутация	1	да
c.1999C>T	p.Gln667X	Нонсенс-мутация	1	да
c.2353_2360del8	p.His785X	Делеция	1	нет
c.2547_2550delTAGA	p.Asp849GlufsX11	Делеция	2	да
c.2590delC	p.His864IlefsX52	Делеция	1	нет
c.2656delC	p.Gln886ArgfsX30	Делеция	1	нет
c.2708_2714del7	p.Asp903ValfsX11	Делеция	1	нет
c.2802_2805delTTAC	p.Tyr935IlefsX19	Делеция	1	да
c.3146G>A	p.Trp1049X	Нонсенс-мутация	1	да
c.3183_3187delACAAA	p.Gln1062X	Делеция	5	да
c.3202_3205delTCAA	p.Ser1068GlyfsX57	Делеция	2	да

кДНК	Белок	Тип мутации	Случаи	Описана ранее
c.3249delT	p.Asp1083GlufsX43	Делеция	1	да
c.3270_3273dupACCA	p.His1092ThrfsX28	Инсерция	1	нет
c.3298_3301delTCTC	p.Ser1100HisfsX25	Делеция	1	да
c.3306C>G	p.Tyr1102X	Нонсенс-мутация	1	да
c.3311C>G	p.Ser1104X	Нонсенс-мутация	1	нет
c.3340C>T	p.Arg1114X	Нонсенс-мутация	1	да
c.3340delC	p.Arg1114GlufsX12	Делеция	1	нет
c.3549T>G	p.Tyr1183X	Нонсенс-мутация	1	нет
c.3571C>T	p.Gln1191X	Нонсенс-мутация	1	нет
c.3596dupA	p.Ser1200GlufsX8	Инсерция	1	да
c.3927_3931delAAAGA	p.Glu1309AspfsX4	Делеция	16	да
c.3929dupA	p.Lys1310LysfsX5	Инсерция	1	нет
c.4031C>G	p.Ser1344X	Нонсенс-мутация	1	да
c.4120G>T	p.Glu1374X	Нонсенс-мутация	1	нет
c.4175C>G	p.Ser1392X	Нонсенс-мутация	1	да
c.4354delG	p.Val1452TyrfsX21	Делеция	1	нет
c.4383_4387dupAAAGA	p.Arg1463LysfsX12	Инсерция	1	нет
c.4400delC	p.Pro1467LeufsX6	Делеция	1	нет
c.4473dupT	p.Ala1492CysfsX22	Инсерция	1	нет

Так, у одной пациентки обнаружена миссенс-мутация c.1240C>T (p.Arg414Cys), которая была описана в базе данных InSiGHT (www.insight-group.org), как вариант неясного значения у больных из популяционных выборок Германии и США (Friedl W, Aretz S., 2005; Azzopardi D. et al., 2008). В связи с этим было принято решение выяснить функциональное значение данного варианта. Важно отметить, что мать данной пациентки, страдавшая аденоматозным полипозом, погибла от метастазов колоректального рака в легкие. Проведено исследование гена *APC* у отца данной больной, у которого в возрасте 60 лет при проведении колоноскопии не было выявлено изменений в толстой кишке. Вариант c.1240C>T (p.Arg414Cys) у него был обнаружен. Этот факт позволяет считать данную миссенс-мутацию не патогенной.

У другого пациента в гене *APC* был найден вариант c.423-6A>G. Этот вариант не встретился в базах данных InSiGHT (www.insight-group.org) и Human Gene Mutation Database (HGMD®) и описывается впервые. При этом интересным представляется тот факт, что данный вариант локализуется в участке гена *APC* до 157 кодона, герминальные мутации в котором в большинстве случаев обуславливают ослабленную форму аденоматозного полипоза, для которой характерно количество полипов менее 100 и возраст развития РТК после 50 лет. Однако при эндоскопическом обследовании у данного пациента в возрасте 42 лет было обнаружено до 300 аденоматозных полипов, а также рак дистальной трети сигмовидной кишки рТ3N0M0. Было проведено выяснение значения данного варианта с помощью программы предсказания сайтов сплайсинга NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>). Для варианта c.423-6G было предсказано равновероятное возникновение обычного акцепторного сайта, а также другого сайта сплайсинга, который был расположен в 5 нуклеотидах перед обычным. Однако, для варианта c.423-6A программа вообще не обнаружила вероятности возникновения обычного акцепторного сайта сплайсинга. Соответственно, данные, которые были получены *in silico*, не позволяют с высокой долей уверенности отнести вариант c.423-6A>G к патогенным. Было проведено исследование кДНК данного пациента, для чего с

помощью программы Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) были подобраны и впоследствии синтезированы праймеры, которые были комплиментарны фрагментам 3 и 5 экзонов, чтобы определить наличие изменений в 4 экзоне гена *APC*. Результаты молекулярно-генетического исследования продемонстрировали, что половина полученных ампликонов имеют длину фрагмента на 5 нуклеотидов больше, чем остальные ампликоны. Таким образом, в результате сплайсинга образуется вариант мРНК, который имеет размер на 5 нуклеотидов больше, чем должен быть в норме, что впоследствии приводит к образованию преждевременного стоп-кодона на расстоянии через 30 кодонов после замены. Соответственно, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что наследственный вариант с.423-6A>G в гене *APC* является истинно патогенной герминальной мутацией, приводящей к появлению альтернативного сайта сплайсинга (Цуканов А.С. и др., 2017).

Среди остальных наследственных вариантов, обнаруженных в гене *APC* у обследованных пациентов было выявлено еще 4 мутации сайта сплайсинга, из которых 3 находились на расстоянии не более 3 нуклеотидов от кодирующего экзона: с.1548+1G>A, с.646-1G>A, с.1312+3A>C, а также вариант с.1958G>C, который представлял из себя замену последнего нуклеотида в кодирующем экзоне. Патогенное значение варианта с.1958G>C уже было установлено ранее (Тао Н. et al., 2010). Остальные 3 варианта также были описаны в базе данных Human Gene Mutation Database (HGMD®), как патогенные.

Наиболее частыми патогенными мутациями у обследованных пациентов с семейным аденоматозом толстой кишки являлись делеции, которые не были кратны трем нуклеотидам и приводили к появлению преждевременного стоп-кодона, встретившиеся у 39 больных. Второе место по частоте встречаемости заняли нонсенс-мутации (28/78). Кроме того, у 6 пациентов были выявлены инсерции, которые также приводили к появлению преждевременного стоп-кодона.

Таким образом, патогенных миссенс-мутаций у пациентов выявлено не было.

Среди выявленных у пациентов мутаций 19 вариантов не встретились в базах данных Human Gene Mutation Database (HGMD®) и InSiGHT (www.insight-group.org), и описываются впервые. Частота впервые обнаруженных вариантов в исследованиях гена *APC*, проводимых у пациентов с САТК из других популяций, также довольно высока и может достигать 40% (Rivera В. et al., 2011). Стоит отметить, что ни одна из мутаций, которые выявлены впервые у обследованных нами больных, не повторилась у пациентов из разных семей.

С другой стороны, было найдено 7 мутаций, которые встретились у двух и более пробандов из разных семей, среди ранее описанных вариантов в базе данных Human Gene Mutation Database (HGMD®). Всего данные повторяющиеся герминальные мутации обнаружены у 35 больных. Наиболее частым вариантом, встретившимся у 16 обследованных пациентов (20,5%), была мутация с.3927_3931delAAAGA (Рис. 7). Данный патогенный вариант с частотой около 20% также занимает первое место по встречаемости и в других популяциях. При этом необходимо отметить, что у 13 пациентов с мутацией с.3927_3931delAAAGA имелся еще один или более пораженный родственник, в двух случаях высока вероятность возникновения варианта *de novo*, а последний больной не располагал данными об одном из родителей и его кровных родственниках. На втором месте расположились сразу две герминальные мутации: с.637C>Т и с.3183_3187delACAAA. Каждая из них встретилась у 5 неродственных пациентов (по 6,4%). При этом у больных из других популяций частота мутации с.3183_3187delACAAA может составлять до 11. Среди 5 больных с мутацией с.637C>Т у четверых пациентов

имелся отягощенный семейный анамнез, а у последнего данный наследственный вариант вероятнее всего, возник *de novo*. Четыре пробанда с мутацией с.3183_3187delACAAA также имели пораженных родственников, а у пятого пациента высока вероятность возникновения мутации *de novo*. Патогенный вариант с.646C>T обнаружен у 3 человек, из которых только у одного больного был отягощенный семейный анамнез, соответственно в 2 случаях данная мутация вероятнее всего возникла *de novo*. Каждая из двух мутаций: с.694C>T и с.3202_3205delTCAA встретила у 2 пациентов, имеющих отягощенный семейный анамнез. Наконец, вариант с.2547_2550delTAGA выявлен у 2 человек, из которых только у одного имелись родственники, страдающие САТК. Соответственно, из 7 повторяющихся мутаций для 5 вариантов (с.3927_3931delAAAGA, с.637C>T, с.3183_3187delACAAA, с.646C>T, с.2547_2550delTAGA) описан минимум 1 случай возникновения его *de novo*. При этом в базе данных Human Gene Mutation Database (HGMD®) каждый из 7 вариантов встретился более одного раза у пациентов из разных популяций.

Количество мутаций

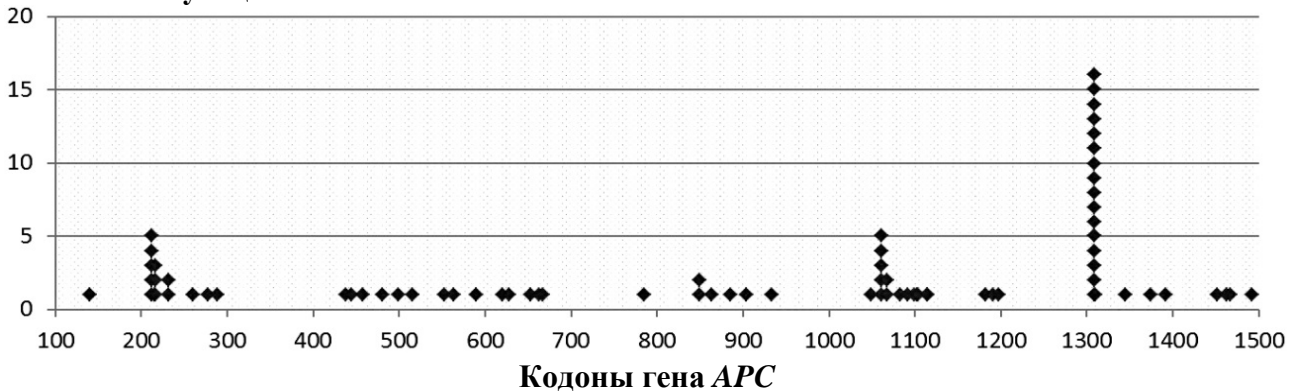


Рисунок 7. Локализация мутаций в гене APC у пациентов с САТК.

Суммарно количество мутаций, с высокой вероятностью возникших *de novo*, составило 17 случаев. При этом необходимо отметить, что 4 герминальные мутации были выявлены среди 5 больных, которые не располагали данными об одном из родителей. Таким образом, частота мутаций *de novo* у обследованных пациентов составила 22,9% (17/74). Эти данные существенно отличаются от результатов, которые были получены в других исследованиях, где частота мутаций *de novo* у больных с САТК составляла от 30% до 40% (Rozen P. et al., 2006). Данное отличие можно объяснить, как наличием популяционных особенностей у российских пробандов, так и тем фактом, что в наш специализированный клинический центр чаще могут поступать больные, у которых имелся отягощенный семейный анамнез с целью прохождения клинического обследования. При этом больным, у которых не встретилось пораженных родственников, в большинстве случаев выполняются хирургические вмешательства, как правило, по экстренным показаниям, в лечебных учреждениях по месту жительства.

В заключение необходимо отметить, что частота мутаций в гене APC у пациентов, имевших более 100 аденоматозных полипов в толстой кишке, составила 72,2% (78/108). При этом количество мутаций *de novo* составило 17, а ранее не описанных патогенных вариантов – 19 случаев. Семь повторяющихся мутаций выявлено у 35 больных. Наиболее часто у пациентов встретились мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания (45/78), а также нонсенс-мутации (28/78), при этом ни одной патогенной миссенс-мутации обнаружено не было. Мутации, выявленные у обследованных больных, локализовались в

гене *APC* со 142 по 1492 кодоны, что говорит о необходимости исследования всех кодирующих экзонов данного гена, а не только участков ДНК, расположенных после 157 кодона.

Отношение генотип-фенотип у пациентов с наличием более 100 аденоматозных полипов и герминальными мутациями в гене *APC*

У 16 (14,8%) из 108 пациентов в возрасте от 15 до 44 лет (средний возраст - 31,8 года) были диагностированы десмоидные опухоли, еще у 4 больных имелись родственники с десмомами. При этом согласно результатам других исследователей, данное новообразование встречается у 10-15% больных аденоматозным полипозом. Мутации в гене *APC* были выявлены у 14 из 20 пробандов. Среди мутаций встретились различные типы: делеции, инсерции и нонсенс-мутации. Необходимо отметить, что мутации у европейских пациентов с десмомами в основном локализируются в участке гена *APC* с 1310 по 2011 кодоны (Bertario L. et al., 2003), в то время как 9 из 14 выявленных нами мутаций у больных находились в регионе гена с 213 по 1309 кодоны, а остальные 5 располагались до 1467 кодона. Эти данные указывают на отсутствие какой-либо корреляции между локализацией и типом мутации в гене *APC* и развитием десмоидной опухоли у обследованных пациентов.

Случаи папиллярного рака щитовидной железы диагностированы у 5 из 108 пациентов в возрасте от 21 до 32 лет (средний возраст – 26 лет), еще у 2 больных имелись родственники с данным заболеванием. Герминальные мутации в гене *APC* были выявлены у пробандов всех 7 семей. При этом встретились все типы патогенных наследственных вариантов: мутация сайта сплайсинга, делеция, инсерция и нонсенс-мутация. Герминальные мутации в гене *APC* локализовались с 437 по 1309 кодоны, что соответствует данным других европейских исследователей, согласно которым мутации у больных семейным аденоматозом толстой кишки, имеющих еще и папиллярный рак щитовидной железы, располагаются в участке между кодонами 140 и 1309 (Cetta F. et al., 2000). Интересным представляется тот факт, что в 2 семьях из 7, в которых имелся случай папиллярного рака щитовидной железы, встретились родственники, у которых была диагностирована опухоль головного мозга, что позволяет установить у них синдром Тюрко. При этом у 101 из 108 пациентов (и в их семьях) данного синдрома не обнаружено ($p=0,004$). Согласно данным, полученным другими европейскими исследователями частота синдрома Тюрко у пациентов (и в семьях) с САТК не превышает 1%, что не позволяет установить достоверную корреляцию между локализацией мутации и развитием опухоли головного мозга у такого рода больных. У обследованных пробандов из 2 данных семей в гене *APC* встретились мутации с.1312+3A>C и с.3183_3187delACAAA, соответственно.

Существует достаточное количество исследований, авторы которых предлагают разделять классическую и тяжелую формы САТК. При этом для классической формы характерно наличие сотен колоректальных полипов у больного, развитие у него РТК в среднем возрасте 40 лет, а также наличие мутации в гене *APC*, которая располагается со 157 кодона по 1595 кодон (за исключением 9 экзона и кодонов 1250 – 1464). В то время, как тяжелая форма устанавливается у пациентов, имеющих несколько тысяч полипов, средний возраст развития РТК составляет 34 года, при этом мутации в большинстве случаев локализируются в участке гена *APC* с 1250 по 1464 кодоны (Ficari F. et al., 2000; Nieuwenhuis M., Vasen H., 2007). Более того, имеются данные, что наиболее частая у европейцев мутация в кодоне 1309 приводит к развитию РТК и гибели от него пациента,

при отсутствии лечения, в среднем на 10 лет раньше, чем у больных с другими мутациями (Friedl W. et al., 2001). Эти данные являются крайне актуальными, поскольку позволяют установить возраст для проведения профилактической операции по удалению толстой кишки у больных САТК в зависимости от локализации мутации в гене *APC*.

В связи с этим было проведено собственное исследование возраста развития РТК у пациентов с наличием мутации p.Glu1309AspfsX4, а также у больных с другими мутациями в гене *APC*. Первоначально данные по возрасту развития колоректального рака были проанализированы у пациентов, имеющих наследственные мутации в участке с 200 по 300 кодон гена *APC*, поскольку данный регион наиболее близок к участку гена с 1 до 157 кодоны, мутации в котором обуславливают возникновение ослабленной формы аденоматозного полипоза, для которой характерно количество колоректальных полипов менее 100, а также возраст развития РТК в возрасте старше 50 лет. У больных, имеющих мутацию в участке гена с 200 по 300 кодон, РТК выявлен в среднем возрасте - 34 года ($\sigma=5$). При этом РТК у пациентов с мутацией p.Glu1309AspfsX4 был диагностирован в среднем возрасте - 33 года ($\sigma=7$). Полученные данные не имели статистически значимых отличий ($p=0,77$). В дальнейшем было проведено сравнение данных возраста возникновения колоректального рака у пациентов с герминальной мутацией p.Glu1309AspfsX4 и больных со всеми остальными мутациями в гене *APC*. Каких-либо статистически значимых отличий ($p=0,87$) не было выявлено. Соответственно, полученные у обследованных пациентов результаты, не дают оснований считать наследственную мутацию p.Glu1309AspfsX4 в гене *APC* более агрессивной, чем остальные герминальные патогенные мутации.

При этом, колоректальный рак был диагностирован у 8 (50%) из 16 пациентов с герминальной мутацией p.Glu1309AspfsX4, у 27 (43,5%) из 62 больных с остальными мутациями, а также у 14 (46,7%) из 30 пробандов без выявленной мутации в гене *APC*. Эти данные также не имеют статистически значимых различий ($p>0,05$), что еще раз указывает на отсутствие целесообразности считать мутацию p.Glu1309AspfsX4 наиболее агрессивной и, соответственно, выполнять хирургическое вмешательство у ее носителя в более раннем возрасте, чем у больных с другими патогенными мутациями. Таким образом, было принято решение установить возраст для выполнения необходимого профилактического хирургического вмешательства, направленного на удаление толстой кишки у пациентов с САТК, в независимости от наличия мутации и ее локализации в гене *APC*, поскольку столь высокая частота (45,4%; 49/108) выявления колоректального рака у больных обусловлена только тем фактом, что в большинстве случаев (83,7%) диагноз САТК и РТК у них устанавливался одновременно. При этом крайне важно отметить, что у 33 больных с РТК было от одного до нескольких кровных родственников, страдающих аденоматозным полипозом, однако это, к сожалению, не послужило причиной для проведения у них эндоскопического обследования толстой кишки или выполнения молекулярно-генетического исследования.

Для установления возраста пациента, в котором ему необходимо выполнять профилактическое хирургическое удаление толстой кишки был построен точечный график для объединенной выборки пациентов в независимости от наличия у больного мутации и ее локализации в гене *APC* (Рис. 8).

Полученные результаты демонстрируют целесообразность выполнения профилактического хирургического удаления толстой кишки у пациентов с САТК в возрасте до 25 лет, что позволит снизить частоту развития злокачественных новообразований в 10 раз (чувствительность критерия составила 91,8%, специфичность –

42,4%, площадь под ROC-кривой 0,722, $p < 0,0001$).

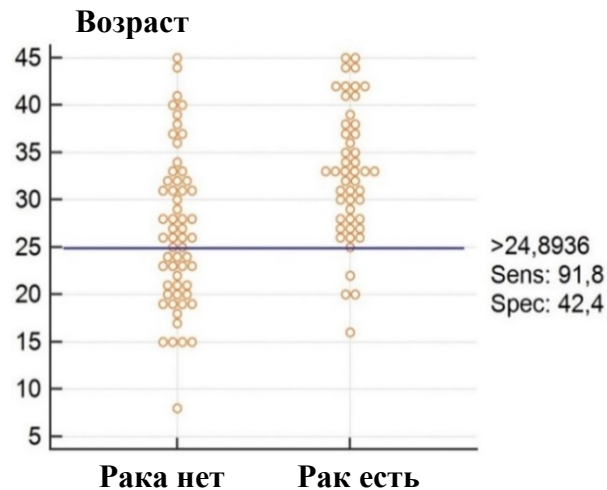


Рисунок 8. Точечный график, демонстрирующий возраст пациента, в котором целесообразно выполнение хирургического вмешательства.

При этом необходима как можно более ранняя постановка клинического диагноза, что позволит проводить своевременный клинический мониторинг больного. Для этого все родственники пациента с САТК, у которых выявлены патогенные мутации в гене *APC* должны проходить ежегодную колоноскопию уже с 10 лет, и при подозрении на возможное озлокачествление одного из колоректальных полипов или по достижению 24,5 лет больному необходимо предлагать выполнение хирургического вмешательства. При отсутствии герминальной мутации в гене *APC* у больного с САТК все его кровные родственники должны включаться в группу риска с проведением ежегодной колоноскопии.

Таким образом, полученные данные демонстрируют отсутствие ранее описанной корреляции между локализацией мутации в гене *APC* и развитием у них десмоидной опухоли. С другой стороны мутации у больных, имеющих рак щитовидной железы, располагались в участке гена, для которого показано наличие генетико-фенотипической корреляции другими исследователями. Синдром Тюрко встретился только в тех семьях, где были случаи рака щитовидной железы ($p=0,004$). Продемонстрировано отсутствие данных, позволяющих считать мутацию p.Glu1309AspfsX4 более агрессивной в сравнении с другими патогенными мутациями в гене *APC*, а, следовательно, не целесообразно выделять тяжелую форму САТК. При этом показано, что всем пациентам с классической формой САТК необходимо выполнение оперативного вмешательства по удалению толстой кишки в возрасте до 25 лет, что позволит снизить частоту развития у них РТК в 10 раз (чувствительность критерия составила 91,8%, специфичность – 42,4%, площадь под ROC-кривой 0,722, $p < 0,0001$).

Герминальные мутации в гене *APC* у пациентов с наличием менее 100 аденоматозных полипов

К настоящему времени в качестве верхней границы ослабленной формы САТК принято наличие менее 100 полипов в толстой кишке, а также установлен возраст развития РТК у больных - после 45-50 лет, при этом четких критериев по нижней границе числа полипов нет, в связи с чем разные исследователи предлагают собственные варианты - от

3 до 30 (Knudsen A.L. et al., 2003; Nielsen M. et al., 2007). Соответственно, было принято решение обследовать пациентов, в возрасте от 46 до 74 лет (средний возраст 58,7), у которых в толстой кишке было выявлено от 4 до 100 аденоматозных полипов. У всех 66 больных (30 женщин и 36 мужчин) было проведено исследование кодирующих экзонов гена *APC*.

У 6 пациентов были выявлены наследственные варианты в гене *APC*. Среди найденных вариантов миссенс-мутация p.Ple1307Lys (c.3920T>A) была выявлена у двух неродственных пациентов. Также были обнаружены мутации p.Lys49AsnfsX20 (c.145_148delAAAC), c.219_220insTA, p.Glu152LisfsX15 (c.453_454delAG) и p.Arg405X (c.1213C>T).

Миссенс-мутация p.Ple1307Lys (c.3920T>A) была описана несколько раз в базах данных InSiGHT (www.insight-group.org) и Human Gene Mutation Database (HGMD®) у пациентов из разных популяций, однако ее патогенное значение остается под вопросом.

Соответственно, было принято решение выяснить функциональное значение данного наследственного варианта. Был проведен поиск этого варианта у клинически здоровых пробандов в возрасте от 46 до 79 лет из контрольной выборки, и выяснилось, что он встретился у 1 из 60 человек. Таким образом, полученные данные по частоте встречаемости варианта p.Ple1307Lys у пациентов с аденоматозными полипами и пробандов контрольной выборки, не имели статистически значимых отличий ($p=1$), что не позволяет отнести герминальный вариант p.Ple1307Lys (c.3920T>A) в гене *APC* к патогенным мутациям.

Герминальная мутация c.145_148delAAAC в гене *APC* была описана ранее в базе данных InSiGHT (www.insight-group.org) как патогенный вариант у 2 пациентов из Испании. При этом у одного из них клинически была установлена ослабленная форма заболевания, а у второго – классическая. У обследованного нами пациента в возрасте 66 лет в толстой кишке было выявлено от 40 до 50 аденоматозных полипов, а также рак сигмовидной кишки, что однозначно указывает на правильность установленного диагноза – ослабленная форма семейного аденоматоза толстой кишки. Оба родителя данного пациента не страдали от аденоматозного полипоза, что указывает на высокую вероятность возникновения варианта *de novo*.

Мутация c.219_220insTA в гене *APC* не встретилась в базах данных InSiGHT (www.insight-group.org) и Human Gene Mutation Database (HGMD®) и описывается впервые. Тот факт, что она приводит к появлению укороченного белка, указывает на ее патогенное значение. Данная мутация выявлена у пациента, у которого в возрасте 48 лет в толстой кишке выявлено около 90 полипов, а также рак сигмовидной кишки. Отец этого пациента погиб от РТК на фоне аденоматозного полипоза в возрасте 49 лет.

Наследственная мутация c.453_454delAG также не встретилась в базах данных InSiGHT (www.insight-group.org) и Human Gene Mutation Database (HGMD®) и описывается впервые. Данная мутация приводит к преждевременному образованию стоп-кодона, соответственно являясь патогенной. Необходимо отметить, что у пациента с данной мутацией в возрасте 49 лет обнаружен синхронный РТК, а также около 90-100 аденоматозных полипов. При этом оба родителя данного пациента были здоровы, что говорит о высокой вероятности возникновения этой мутации в гене *APC de novo*.

Мутация c.1213C>T в гене *APC* была описана как патогенная в базах данных InSiGHT (www.insight-group.org) и Human Gene Mutation Database (HGMD®) у пациентов с ослабленной формой САТК из разных популяций. Данный вариант найден у пациента в возрасте 52 лет, у которого при эндоскопическом обследовании толстой кишки

обнаружилось около 50 аденоматозных полипов, однако РТК не было. Отягощенного наследственного анамнеза у больного не прослеживалось.

Таким образом, у обследованных пациентов было выявлено 4 патогенные наследственные мутации, три из которых в первичной структуре гена *APC* располагались в участке до 157 кодона, а последняя в кодоне 405 (экзон 9), что согласуется с данными, полученными другими исследователями на выборках больных с ослабленной формой САТК. Две герминальные мутации были описаны впервые. Для трех патогенных мутаций показана высокая вероятность возникновения *de novo*. Обращает на себя внимание тот факт, что наследственные мутации выявлены только у тех больных, у которых в толстой кишке было обнаружено более 40 аденоматозных полипов. Всего таких пробандов было 16 человек. При этом результаты по встречаемости мутаций преимущественно у больных, имеющих от 40 до 100 колоректальных полипов имели статистически значимые отличия в сравнении с данными, полученными у 50 пациентов, у которых было от 4 до 40 полипов ($p=0,0025$). Однако вводить количество колоректальных полипов более 40 в качестве критерия нижней границы ослабленной формы аденоматозного полипоза представляется преждевременным, поскольку известно, что у больных с аденоматозными полипами могут встречаться герминальные мутации в гене *MutYH*.

***MutYH* - ассоциированный полипоз**

У 62 больных, у которых было от 4 до 100 полипов, но не встретилась мутация в гене *APC*, был проведен поиск патогенных вариантов в гене *MutYH*. Наследственные мутации в гене *MutYH* были выявлены у 8 пациентов. Среди найденных мутаций было 6 биаллельных миссенс-мутаций и 2 гетерозиготные миссенс-мутации.

Одной из гетерозиготных миссенс-мутаций была ранее описанная патогенная мутация p.G169D (с.506G>A).

Поскольку известно, что даже гетерозиготные мутации в гене *MutYH* могут приводить к развитию аденоматозных полипов и РТК у пациентов из некоторых европейских популяций, было принято решение выяснить наличие ассоциации с заболеванием данного герминального варианта. Для этого первоначально было проведено молекулярно-генетическое исследование у 150 человек контрольной выборки. Данный вариант у них обнаружен не был. Необходимо отметить, что у пациента с данной миссенс-мутацией в возрасте 54 лет было выявлено 23 аденоматозных полипа и рак сигмовидной кишки, при этом выяснилось, что у матери данного пациента также диагностирован РТК в возрасте 49 лет на фоне аденоматозных полипов. Все эти данные указывают, на то, что патогенный вариант p.G169D может быть ассоциирован с развитием аденоматозных полипов и РТК у пробанда.

Второй гетерозиготной миссенс-мутацией был вариант p.G382D (с.1145G>A). Данный наследственный вариант является одной из двух наиболее часто встречающихся герминальных мутаций у европейских пациентов с аденоматозным полипозом. Как правило, этот вариант может находиться у пробандов в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии, однако есть большое количество данных, о его повышенной частоте у больных в сравнении с контрольной выборкой и в гетерозиготном (как в нашем случае) состоянии (Cleary S. P., 2009). Важно отметить, что у обследованных 150 человек контрольной выборки, данного варианта также обнаружено не было. У пациента с миссенс-мутацией p.G382D в возрасте 58 лет были обнаружены около 30-40 аденоматозных полипов, а также рак восходящей ободочной кишки. Описанные данные

демонстрируют высокую вероятность патогенного значения гетерозиготной миссенс-мутацией p.G382D в гене *MutYH*.

У одной пациентки была обнаружена биаллельная миссенс-мутация p.Y165C/p.G169D. Важно отметить, что у нее в возрасте 48 лет был диагностирован РТК, а количество аденоматозных полипов составило около 80. При этом данными об одном из родителей она не располагала.

Биаллельная миссенс-мутация p.Y165C/p.R231H была выявлена у больной, у которой в возрасте 46 лет был диагностирован синхронный рак слепой и восходящей ободочной кишки, а также обнаружено около 100 аденоматозных полипов.

Гомозиготная миссенс-мутация p.C165C встретила у двоих пациентов. У одной больной в возрасте 58 лет в толстой кишке выявлено около 60 аденоматозных полипов, при этом РТК у нее не было, а семейный анамнез был не отягощен. У второго пациента диагностирован РТК в 59 лет, при этом у него выявлено около 100 аденоматозных полипов. Мать пациента умерла в возрасте 46 лет, а брат был оперирован в 55 лет по поводу РТК.

Гомозиготная миссенс-мутация p.D382D выявлена также у двоих пробандов. У первого больного в возрасте 59 лет диагностирован синхронный рак сигмовидной и слепой кишки, а также около 80 аденоматозных полипов. У отца данного пациента в 76 лет были диагностированы РТК и рак желудка, а у брата в 59 лет РТК. У второй пациентки в возрасте 64 лет диагностирован РТК, а также обнаружено около 50 – 60 полипов, при этом у младшей сестры и родной тетки данной больной был диагностирован РТК.

Таким образом, у пациентов с гетерозиготными мутациями в гене *MutYH* было диагностировано от 23 до 30-40 аденоматозных полипов, а у больных с биаллельными мутациями выявлено от 50-60 до 100 колоректальных полипов. Как уже было сказано выше, 4 герминальные мутации в гене *APC* были найдены у пациентов, имеющих от 40 до 100 полипов в толстой кишке. Соответственно, суммарное количество мутаций в генах *APC* и *MutYH* составило 12 случаев среди пациентов, у которых было диагностировано от 20 до 100 аденоматозных полипов. Всего таких больных было 30 человек. При этом среди 36 больных, у которых выявлено от 4 до 20 полипов герминальных мутаций в генах *APC* и *MutYH* не обнаружено. Эти данные имеют статистически значимое отличие ($p < 0,0001$). Таким образом, можно говорить о целесообразности введения критерия нижней границы ослабленной формы аденоматозного полипоза:

Ослабленную форму аденоматозного полипоза необходимо диагностировать у пациентов в возрасте после 45 лет, у которых в толстой кишке выявлено от 20 до 100 аденоматозных полипов.

Полученные данные являются крайне актуальными, поскольку позволяют проводить дифференциальный диагноз пациентов со спорадическими колоректальными полипами и больных с ослабленной формой аденоматозного полипоза, так как именно с учетом данного аспекта принимается решение о выполнении расширенного или стандартного объема оперативного вмешательства в том случае, когда у больных выявляется колоректальный рак.

Кроме того, поиск наследственных мутаций в гене *MutYH* был осуществлен у 30 пациентов, у которых выявлено более 100 аденоматозных колоректальных полипов в возрасте до 45 лет, но при этом отсутствовали герминальные мутации в гене *APC*.

У одной 36-летней пациентки в гене *MutYH* была выявлена гетерозиготная миссенс-мутация p.G382D. Необходимо отметить, что у данной больной уже в 16 лет был диагностирован РТК, у ее брата, у которого также имелась гетерозиготная наследственная

мутация p.G382D, также диагностированы аденоматозные полипы, их отец погиб от РТК на фоне аденоматозного полипоза в возрасте 53 лет. Родословная данной семьи демонстрирует скорее аутоматно-доминантный тип наследования, что также указывает на значимость гетерозиготной мутации p.G382D в гене *MutYH* в возникновении аденоматозного полипоза у обследованных родственников.

Таким образом, суммарно гетерозиготные мутации в гене *MutYH* выявлены у 3 из 56 человек, у которых было более 20 аденоматозных полипов в толстой кишке (у 26 пациентов от 20 до 100, у 30 больных более 100), а также отсутствовала наследственная мутация в гене *APC*. При этом ни одной аналогичной мутации не встретилось у 150 человек контрольной выборки. Эти данные имеют статистически значимое отличие ($p=0,019$), что указывает на тот факт, что даже гетерозиготные мутации в гене *MutYH* могут обуславливать аденоматозный полипоз.

Молекулярно-генетическое и фенотипическое исследование пациентов с синдромом Пейтца-Егерса

Молекулярно-генетическое исследование гена *STK11* проведено у 8 пациентов из 6 семей (в одной семье были обследованы мать и 2 детей). Среди них было 7 женщин и 1 мужчина в возрасте от 29 до 63 лет (Табл. 7). Наследственные мутации в гене *STK11* были выявлены у пробандов из 4 семей. Частота встречаемости мутаций у пациентов из других европейских популяций также составляет около 70%. Среди 4 выявленных мутаций была мутация сайта сплайсинга, расположенная в 1 нуклеотиде от экзона и 2 делеции, приводящие к сдвигу рамки считывания, соответственно все они являлись истинно патогенными: c.598-1G>A, c.1009_1010delGT, c.933_936delGAAA. Еще была выявлена миссенс-мутация c.200T>C (p.L67P), патогенное значение которой было продемонстрировано ранее (Hemminki A. et al., 1998). Первые три мутации не встретились в базе данных Human Gene Mutation Database (HGMD®) и описываются впервые (Шелыгин Ю.А. и др. 2016). Какой-либо корреляции между типом мутации и возрастом или тяжестью клинических проявлений не установлено, что может быть обусловлено небольшим размером выборки пациентов.

У всех обследованных пациентов для выяснения особенностей клинической картины анализировались возраст и условия установления диагноза, плановое/экстренное хирургическое вмешательство, наличие гамартромных образований в желудке и толстой кишке, число полипэктомий, данные по злокачественным новообразованиям. Кроме того, все пациенты анализировались с точки зрения международных критериев отбора.

Таблица 7. Данные по пациентам с синдромом Пейтца-Егерса.

Пол	Год рождения	Диагноз лет	Пигментация	Полипы в тонкой кишке	Семейная история	Мутация в гене <i>STK11</i>
Ж	1954	25	Есть	Есть	Есть	c.598-1G>A
Ж	1980	24	Есть	Есть	Есть	c.933-936del4
Ж	1980	19	Есть	Есть	Нет	-
Ж	1985	14	Есть	Есть	Нет	p.L67P
Ж	1973	16	Есть	Есть	Есть	-
Ж*	1951	29	Есть	Есть	Нет	c.1009_1010del2
Ж*	1973	12	Есть	Есть	Есть	
М*	1975	10	Есть	Есть		

Примечание: * - кровные родственники.

Необходимо указать, что у 2 из 8 обследованных пациентов диагноз синдрома Пейтца-Егерса был установлен только при проведении хирургического вмешательства по экстренным показаниям. При этом аналогичного экстренного хирургического вмешательства не удалось избежать и другим 4 больным, у которых синдром Пейтца-Егерса был установлен при проведении планового обследования. Соответственно, у большинства больных были выполнены хирургические резекции различных отделов тонкой кишки по экстренным показаниям, в то время, как в большинстве европейских стран подобных пациентов рекомендуется клинически наблюдать и проводить им плановые хирургические вмешательства только в специализированных медицинских центрах, для чего были разработаны и внедрены критерии отбора подобного рода больных. Данные критерии включали наличие гамартомных полипов в тонкой кишке, кожно-слизистую пигментацию в области рта, а также возможный отягощенный семейный анамнез (Jasperson K. et al., 2010).

При этом необходимо отметить, что у всех обследованных больных определялась типичная кожно-слизистая пигментация, которая встречается и у 95% пациентов по данным других европейских исследователей (Beggs A. et al., 2010). Число гамартомных полипов в разных отделах тонкой кишки у них было более 3 (от 5 и выше), а у 3 человек в семье был еще один кровный родственник с синдромом Пейтца-Егерса. Соответственно, у всех обследованных больных определялось минимум два из трех описанных критериев, таким образом, точный диагноз мог быть им установлен еще до выполнения операции по экстренным показаниям. При этом именно правильно установленный в раннем возрасте клинический диагноз позволяет своевременно выполнять у пациентов все медицинские обследования согласно рекомендациям разработанного клинического мониторинга, для больных с синдромом Пейтца-Егерса.

Среди 5 обследованных пациентов, у которых имелся отягощенный семейный анамнез, средний возраст постановки клинического диагноза составил 17,4 года (от 10 до 25 лет). В то время, как у больных, в чьих семьях не было родственников с синдромом Пейтца-Егерса, диагноз был установлен в среднем возрасте 20,6 лет (от 14 до 29 лет). Соответственно, у всех больных диагноз синдрома Пейтца-Егерса был установлен в возрасте после 8 лет, который предполагает необходимость начала проведения эзофагогастродуоденоскопии с частотой 1 раз в 2-3 года, а также капсульной эндоскопии отделов тонкой кишки с аналогичной регулярностью. При этом у половины обследованных больных из-за отсутствия клинического диагноза в возрасте до 18 лет не началось выполнение колоноскопии, которую необходимо проводить также 1 раз в 2-3 года, а также не проводились ежегодные УЗИ обследования органов малого таза у женщин. Более того, поскольку у двух больных синдром Пейтца-Егерса был диагностирован в возрасте 25 и 29 лет, у них была пропущена дата выполнения первой маммографии (Kastrinos F., Syngal S., 2011).

Частота встречаемости колоректальных гамартомных полипов у обследованных пациентов (62,5%; 5/8) в два раза превышает таковую у других европейских больных (30%). Полипы в желудке диагностированы у 6 из 8 пациентов (75%), что также существенно чаще чем у других европейских пациентов (25%) (Jasperson K. et al., 2010).

Необходимо отметить высокую частоту встречаемости злокачественных новообразований у обследованных больных, которая составила 62,5% (5/8), с учетом метакронного РТК у одной пациентки. Указанная частота почти в 3 раза превышает показатели, продемонстрированные в наиболее репрезентативном мультицентровом исследовании 149 больных с синдромом Пейтца-Егерса, у которых суммарно было

выявлено только 32 случая рака (21,5%) ($p=0,0184$) (Mehenni H. et al., 2006.). При этом средний возраст возникновения первой опухоли у обследованных нами пациентов составил 34 года (17-48), в то время как в указанном исследовании риск возникновения рака, в независимости от локализации, именно в данном возрасте не превышал 10%. По данным зарубежных исследователей у больных чаще других развивался рак молочной железы (Giardiello F. et al., 2000), который был диагностирован и у 2 обследованных нами пациенток. У одной из этих больных диагностирован метастатический РТК. У 1 пациентки был выявлен рак шейки матки, а еще у одной рак яичников. При этом рак яичников был диагностирован у больной в возрасте 17 лет, что указывает на целесообразность проведения УЗИ матки с придатками в более раннем возрасте, чем тот, который указывается зарубежными исследователями (18 лет) (Kastrinos F., Syngal S., 2011).

Описанная тяжелая клиническая картина российских пациентов с синдромом Пейтца-Егерса указывает на целесообразность повышенного внимания со стороны врачей ко всем членам семьи уже с раннего возраста и необходимость проведения у них исследования гена *STK11* с целью включения в группу риска всех носителей патогенного варианта и проведения у них пожизненного клинического мониторинга, что позволит проводить удаление гамартомных полипов еще до начала их злокачественной трансформации.

Алгоритм молекулярно-генетической диагностики и терапии пациентов с наследственными формами колоректального рака

Генетико-фенотипическое исследование, которое было проведено у 351 пациента, среди которых: 171 больной с неполипозным колоректальным раком, 174 больных с разными формами аденоматозного полипоза, а также 8 пациентов с синдромом Пейтца-Егерса, позволило выяснить частоту и спектр герминальных мутаций в различных генах предрасположенности к наследственным формам колоректального рака, характерных для больных из российской популяции. Кроме того, изучались клинические данные пациентов, такие как диагноз и возраст развития заболевания, количество пораженных родственников и данные по их онкологическим заболеваниям.

Результаты клинико-генетического исследования российских пациентов способствовали разработке алгоритма исследования генов *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *APC*, *MutYH* и *STK11*, а также рекомендаций по персонализированному клиническому мониторингу и лечению больных с наследственными формами колоректального рака (Рис. 9). Разработанный алгоритм был внедрен в практику ФГБУ «ГНЦК им. А.Н. Рыжих» Минздрава России и ФГБНУ "МГНЦ".

Исследование генов, герминальные мутации в которых отвечают за развитие различных наследственных форм колоректального рака, открывает новые возможности для медико-генетического консультирования, поскольку позволяет подтвердить генетический диагноз и рассчитать риск возникновения болезни. Кроме того, в условиях специализированного онкологического диспансера появляется возможность формирования групп риска из кровных родственников пациента, которые являются носителями патогенной мутации с целью разработки для них клинического мониторинга, а также выполнения необходимого объема оперативного вмешательства в случае развития первой опухоли в толстой кишке.



Рисунок 9. Алгоритм молекулярно-генетической диагностики и терапии пациентов с наследственными формами колоректального рака (зеленая стрелка – наличие признака (микросателлитная нестабильность или герминальная мутация), красная стрелка – отсутствие признака).

ВЫВОДЫ

1. Разработанные оригинальные критерии отбора пациентов с подозрением на синдром Линча, включают возраст развития колоректального рака у пробанда до 43 лет или наличие у больного двух и более кровных родственников со злокачественными новообразованиями. Показатели чувствительности предложенных критериев превышают таковые для рекомендаций, принятых ранее.
2. Молекулярно-генетическое исследование, проведенное у 23 пациентов с колоректальным раком, имеющих отягощенный семейный анамнез, показало, что у всех пациентов с мутациями в генах системы репарации ДНК встречается микросателлитная нестабильность в опухоли, что указывает на необходимость её поиска в качестве первого этапа отбора пациентов с синдромом Линча ($p < 0,0001$). При этом проводить детекцию герминальной мутации в генах системы репарации необходимо только в случае выявления микросателлитной нестабильности.
3. У российских пациентов с синдромом Линча вторым по частоте злокачественным новообразованием является рак желудка (11,2%), в отличие от европейских и американских больных. Проанализированная частота злокачественных новообразований других органов составила: колоректальный рак - 71,2%, рак тела матки – 7,7%, опухоли мочевыделительной системы - 3,5%, рак молочной железы – 2,4%, опухоли головного

мозга – 1,2%. Поражение других органов выявлено в 2,8% случаев. Рак желудка встретился с высокой частотой в семьях с наследственными мутациями в гене *MLH1* (12,1%) и в гене *MSH2* (10,3%) ($p=0,8$), в то время как рак тела матки чаще обнаруживался в семьях с мутациями в гене *MSH2* ($p=0,03$). Опухоли органов мочевыделительной системы выявлены только в семьях с мутациями в гене *MSH2* ($p=0,004$). Рак щитовидной железы диагностирован у одного пробанда с герминальной мутацией в гене *PMS1* ($p=0,02$).

4. Молекулярно-генетическое исследование, проведенное у 56 пациентов с наличием более 20 аденоматозных полипов, у которых не встретилась мутация в гене *APC*, и 150 пробандов контрольной выборки, позволило установить патогенное значение не только биаллельных, но и моноаллельных мутаций в гене *MutYH* для развития аденоматозного полипоза.
5. Обнаружение у одного из пациентов с наличием более 100 аденоматозных полипов в толстой кишке мутации с.423-6A>G в гене *APC*, не характерной для данной формы заболевания, определяет необходимость исследования всех кодирующих экзонов гена *APC* у такого рода больных.
6. Установлено отсутствие целесообразности выделения тяжелой формы аденоматозного полипоза в зависимости от локализации мутации в гене *APC* ($p=0,87$). Показано, что всем пациентам с классической формой аденоматозного полипоза необходимо выполнение оперативного вмешательства по удалению толстой кишки в возрасте до 25 лет, что позволит снизить частоту развития у них колоректального рака в 10 раз (чувствительность данного критерия составила 91,8%, специфичность – 42,4%, $p<0,0001$).
7. Разработан критерий, позволяющий проводить дифференциальный диагноз между пациентами с ослабленной формой аденоматозного полипоза и больными со спорадическими полипами, согласно которому наличие более 20 аденоматозных полипов в толстой кишке является нижней границей ослабленной формы полипоза ($p<0,0001$).
8. Частота злокачественных новообразований у обследованных пациентов с синдромом Пейтца-Егерса превысила таковую у европейских и американских больных ($p=0,018$). У 4 из 6 пробандов выявлены герминальные мутации в гене *STK11*, 3 из которых не были описаны ранее.

ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

1. Для обнаружения пациентов с синдромом Линча рекомендуется исследование образца опухоли на наличие микросателлитной нестабильности у всех больных колоректальным раком в возрасте до 43 лет, или пациентов, имеющих онкологически отягощенный семейный анамнез. В случае обнаружения микросателлитной нестабильности показано исследовать гены системы репарации ДНК, начиная с поиска герминальных мутаций в генах *MLH1* и *MSH2*.
2. У всех носителей мутации, обуславливающей синдром Линча, рекомендуется проведение ежегодной колоноскопии и эзофагогастродуоденоскопии, начиная с возраста 22 и 27 лет, соответственно. Всем женщинам показано ежегодное выполнение УЗИ матки

с придатками и проведение маммографии, начиная с возраста 27 и 30 лет, соответственно. Носителям мутации в гене: *MSH2* рекомендовано проведение ежегодного обследования органов мочевыделительной системы и выполнение анализа мочи, начиная с возраста 32 лет; *PMS1* – ежегодное обследование щитовидной железы, начиная с возраста 40 лет; *MLH1* - ежегодное выполнение МРТ головы, начиная с 22 лет, если в семье встретился хотя бы один случай опухоли головного мозга.

3. У пациентов с наличием более 100 аденоматозных полипов рекомендуется начинать молекулярно-генетическое исследование с гена *APC*, а при отсутствии в нем мутации, анализировать ген *MutYH*, а у больных с наличием менее 100 аденоматозных полипов в первую очередь рекомендован поиск мутаций в гене *MutYH*.

4. Всем пациентам с классической формой аденоматозного полипоза рекомендовано выполнение оперативного вмешательства по удалению толстой кишки в возрасте до 25 лет.

5. Наличие более 20 аденоматозных полипов в толстой кишке является клиническим признаком ослабленной формы аденоматозного полипоза, а менее 20 полипов характерно для спорадической формы заболевания.

6. Рекомендовано выполнение молекулярно-генетического исследования у кровных родственников пациентов с синдромом Пейтца-Егерса в раннем возрасте для проведения своевременного клинического мониторинга в специализированном медицинском центре всех носителей мутации в гене *STK11*.

7. Разработан и внедрен Алгоритм молекулярно-генетической диагностики и терапии пациентов с наследственными формами колоректального рака, позволяющий формировать группы риска из больных и их кровных родственников, являющихся носителями патогенной мутации, с целью проведения у них клинического мониторинга, а также выполнения необходимого объема оперативного вмешательства в случае развития рака толстой кишки.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК МОН РФ:

1. Шельгин Ю.А., Кашников В.Н., Фролов С.А., Кузьминов А.М., Сачков И.Ю., Порхаева А.А., Завадский С.В., Шубин В.П., Поспехова Н.И., **Цуканов А.С.** Молекулярно-генетическое исследование наследственной предрасположенности к разным формам полипоза толстой кишки // **Колопроктология**. 2013. №1. С. 9 - 14.

2. Кузьминов А.М., Фролов С.А., Сачков И.Ю., Чубаров Ю.Ю., Поспехова Н.И., **Цуканов А.С.**, Шельгин Ю.А. Ослабленная форма семейного аденоматоза: клинико-генетические особенности и лечебная тактика // **Вопросы онкологии**. 2013. Т. 59. № 6. С. 745-750.

3. Поспехова Н.И., Шубин В.П., Ачкасов С.И., Кашников В.Н., Фролов С.А., **Цуканов А.С.**, Шельгин Ю.А. Синдром Линча среди российских больных колоректальным раком с отягощенным анамнезом // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. 2014. № 1. С. 59-64.

4. Шубин В.П., Поспехова Н.И., **Цуканов А.С.**, Рыбаков Е.Г., Панина М.В., Сушков О.И., Ачкасов С.И., Жданкина С.Н., Кашников В.Н., Фролов С.А., Шельгин Ю.А. Частота

и спектр мутаций в гене KRAS при раке толстой кишки разной локализации и раке анального канала // **Медицинская генетика**. 2014. №5. С. 31 – 35.

5. Поспехова Н.И., **Цуканов А.С.**, Шубин В.П., Сачков И.Ю., Ачкасов С.И., Кашников В.Н., Фролов С.А., Шельгин Ю.А. Молекулярно-генетическая диагностика основных наследственных форм колоректального рака // **Медицинский алфавит**. 2014. Т. 1. №2. С.11-15.

6. Семенов Д.А., Ачкасов С.И., **Цуканов А.С.**, Сушков О.И. Синдром Линча. От «семьи G» до ДНК-диагностики (обзор литературы) // **Колопроктология**. 2014. №3. С. 57 – 61.

7. **Цуканов А.С.**, Поспехова Н.И., Шубин В.П., Сачков И.Ю., Жданкина С.Н., Пономаренко А.А., Рыбаков Е.Г., Ачкасов С.И., Кашников В.Н., Фролов С.А., Шельгин Ю.А. Дифференциальный диагноз синдрома Линча от других форм неполипозного колоректального рака среди российских пациентов // **Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии**. 2014. Т. 24. № 2. С. 78-84.

8. **Цуканов А.С.**, Шубин В.П., Поспехова Н.И., Сачков И.Ю., Кашников В.Н., Шельгин Ю.А. Наследственные раки желудочно-кишечного тракта // **Практическая онкология**. 2014. Т. 15. № 3. С.126 – 133.

9. **Цуканов А.С.**, Поспехова Н.И., Шубин В.П., Сачков И.Ю., Ачкасов С.И., Рыбаков Е.Г., Фролов С.А., Кашников В.Н., Шельгин Ю.А. Клинико-генетические особенности российских пациентов с синдромом Линча // **Молекулярная медицина**. 2015. № 1. С. 24-28.

10. Поспехова Н.И., Шубин В.П., **Цуканов А.С.**, Кашников В.Н., Фролов С.А., Ачкасов С.И., Сушков О.И., Шельгин Ю.А. Эпителиально-мезенхимальный переход при колоректальном раке разных стадий // **Молекулярная медицина**. 2015. № 1. С. 34-38.

11. **Цуканов А.С.**, Поспехова Н.И., Шубин В.П., Кузьминов А.М., Сачков И.Ю., Кашников В.Н., Фролов С.А., Шельгин Ю.А. Определение функциональной значимости варианта с.423-6A>G в гене APC у пациента с клиническими признаками семейного аденоматоза толстой кишки // **Медицинская генетика**. 2015. № 10. С. 25-28.

12. Шельгин Ю. А., Шубин В. П., Фролов С. А., Ачкасов С. И., Сушков О. И., **Цуканов А. С.**, Кашников В. Н., Поспехова Н. И. Анализ экспрессии микроРНК miR-200c и miR-145 в колоректальных раках разных молекулярно-генетических подтипов // **Доклады Академии наук**. 2015. Т. 463. №4. С. 491-495.

(Shelygin Y. A., Shubin V. P., Frolov S. A., Achkasov S. I., Sushkov O. I., **Tsukanov A. S.**, Kashnikov V. N., Pospekhova N. I. The analysis of microRNAs miR-200C and miR-145 expression in colorectal cancer of different molecular subtypes // **Doklady Biochemistry and Biophysics**. 2015. V. 463. № 1, P. 243-246).

13. Шельгин Ю.А., Поспехова Н.И., Шубин В.П., Кашников В.Н., Фролов С.А., Кузьминов А.М., Майновская О.А., Сачков И.Ю., **Цуканов А.С.** Пилотное клинико-генетическое исследование российских пациентов с синдромом Пейтца-Егерса // **Вопросы онкологии**. 2016. Т.62. №1. С. 112-116.

14. **Цуканов А.С.**, Шельгин Ю.А., Семенов Д.А., Пикунов Д.Ю., Поляков А.В. Синдром Линча. Современное состояние проблемы // **Медицинская генетика**. 2017. № 2. С. 11-18.

15. **Цуканов А. С.**, Шельгин Ю. А., Фролов С. А., Кузьминов А. М. Семейный аденоматоз толстой кишки // **Хирург**. 2017. № 3. С. 14-24.

16. **Цуканов А.С.**, Шубин В.П., Поспехова Н.И., Ачкасов С.И., Семенов Д.А., Варданян А.В., Кашников В.Н., Шельгин Ю.А. Синдром Линча у российских пациентов // **Вопросы онкологии**. 2017. Т.63. № 1. С. 110-114.

17. **Цуканов А.С.**, Поспехова Н.И., Шубин В.П., Кузьминов А.М., Кашников В.Н., Фролов С.А., Шельгин Ю.А. Мутации в гене APC у российских пациентов с классической формой семейного аденоматоза толстой кишки // **Генетика**. 2017. Т.53. № 3. С. 356-363.

(**Tsukanov A. S.**, Pospekhova N. I., Shubin V. P., Kuzminov A. M., Kashnikov V. N., Frolov S. A., and Shelygin Yu. A. Mutations in the APC Gene in Russian Patients with Classic Form of Familial Adenomatous Polyposis // **Russian journal of genetics**. 2017. V. 53. № 3. P. 369-375).

18. Ачкасов С.И., Назаров И.В., **Цуканов А.С.**, Майновская О.А., Семёнов Д.А., Калашникова И.А. Ликвидация обширного дефекта передней брюшной стенки после рецидива рака ободочной кишки у больного с синдромом Линча // **Колопроктология**. 2017. № 1. С. 31-37.

19. **Цуканов А.С.**, Шельгин Ю.А., Шубин В.П. Микросателлитная нестабильность при колоректальном раке (обзор литературы) // **Колопроктология**. 2017. № 2. С. 100-104.

ПАТЕНТ

Подана заявка на патент: №20171108423 от 14.03.2017 «Способ лечения рака толстой кишки II стадии». Шельгин Ю.А., Ачкасов С.И., Сушков О.И., Шахматов Д.Г., **Цуканов А.С.**, Шубин В.П.

Публикации в других изданиях

20. **Tsukanov A.S.**, Shelygin Y.A., Kashnikov V.N., Kuzminov A.M., Sachkov I.Y., Zavadskiy S.V., Shubin V.P., Pospekhova N.I. Molecular-genetic investigation of hereditary predisposition to different forms of large intestins polyposis // *Eur J Hum Genet*. 2013. V. 21. Suppl. 2. P.315.

21. **Tsukanov A.S.**, Shelygin Yu.A., Rybakov E.G., Kashnikov V.N., Pospekhova N.I., Shubin V.P., Achkasov S.I., Sushkov O.I. Frequency of Lynch syndrome in Russian patients with colorectal cancer // *Colorectal Dis*. 2013. V. 15. Suppl. 3. P. 101.

22. Sachkov I., Kuzminov A., Chubarov Y., **Tsukanov A.**, Pospekhova N. Clinic-genetical characteristics and treatment of patients with attenuated familial adenomatous polyposis (aFAP) // *Colorectal Dis*. 2013. V.15. Suppl. 3. P. 114.

23. Shelygin Yu., Pospekhova N., Shubin V., Kashnikov V., Frolov S., Sushkov O., Achkasov S., **Tsukanov A.** Epithelial-mesenchymal transition and somatic alteration in colorectal cancer with and without peritoneal carcinomatosis // *BioMed Research International*. V. 2014. Article ID 629496. P.1-7.

24. **Tsukanov A. S.**, Pospekhova N. I., Shubin V. P., Sachkov I. Y., Kuzminov A. M., Kashnikov V. N., Shelygin Y. A. Molecular-genetic investigation of aFAP/MAF syndromes among Russian patients // *Eur J Hum Genet*. 2014. V. 22. Suppl. 1. P. 456.

25. **Tsukanov A.S.**, Shelygin Yu.A., Kashnikov V.N., Kuzminov A.M., Sachkov I.Yu., Shubin V.P., Pospekhova N.I. Molecular-genetic investigation of hereditary predisposition to classic form of FAP // *Colorectal Dis*. 2014. V. 16, Suppl. 3. P. 92.

26. **Tsukanov A.S.**, Shelygin Yu.A., Shubin V.P., Sachkov I.Yu., Semenov D.A., Achkasov S.I., Kashnikov V.N., Pospekhova N.I. Germline mutations in MMR genes among Russian patients with Lynch syndrome // *Eur J Hum Genet*. 2015. V. 23. Suppl. 1. P. 448.

27. **Tsukanov A.S.**, Shelygin Yu.A., Kuzminov A.M., Sachkov I.Yu., Shubin V.P., Pospekhova N.I. Molecular-genetic analysis of the APC gene among Russian patients with classic form of FAP // *Fam Cancer*. 2015. V. 14. Suppl 1. P.50.

28. **Tsukanov A.S.**, Shelygin Y.A., Kashnikov V.N., Kuzminov A.M., Sachkov I.Y., Shubin V.P., Pospekhova N.I. Germline mutations in APC and MYH genes among Russian patients with aFAP and MAP syndromes // *Colorectal Dis.* 2015. V. 17. Suppl. 2. P. 99.

29. Achkasov S.I., Semenov D.A., **Tsukanov A.S.**, Pospekhova N.I., Shubin V.P. Clinical aspects of Lynch syndrome in Russia // *Colorectal Dis.* 2015. V. 17. Suppl. 2. P. 63-64.

30. **Tsukanov A.S.**, Shubin V.P., Pospekhova N.I., Sachkov I.Y., Kuzminov A.M., Kashnikov V.N., Shelygin Y.A. The investigation of APC mutations in Russian patients with Familial Adenomatous Polyposis // *Eur J Hum Genet.* 2016. V. 24. Suppl.1. P. 465.

31. **Tsukanov A.S.**, Achkasov S.I., Shubin V.P., Vardanyan A.V., Semenov D.A., Frolov S.A., Kashnikov V.N., Shelygin Y.A., Pospekhova N.I. Clinical and genetic characteristics of the Russian patients with Lynch syndrome // *Colorectal Dis.* 2016. V. 18. Suppl. 1. P.108.

32. Сачков И.Ю., Шельгин Ю.А., Кашников В.Н., Фролов С.А., Кузьминов А.М., Шубин В.П., Поспехова Н.И., **Цуканов А.С.** Исследование герминальных мутаций в гене APC у российских пациентов с классической формой семейного аденоматоза толстой кишки». **Вопросы Онкологии.** 2013. Приложение №3. Т. 59. С. 642.

33. **Цуканов А.С.**, Шельгин Ю.А., Кашников В.Н., Орехов О.О., Шубин В.П., Поспехова Н.И., Калинин Д.В., Рыбаков Е.Г. Применение молекулярно-генетического и иммуногистохимического методов для определения микросателлитной нестабильности при колоректальном раке // **Вопросы Онкологии.** 2013. Приложение №3. Т. 59. С. 667.

34. Поспехова Н.И., **Цуканов А.С.**, Шубин В.П., Ачкасов С.И., Кашников В.Н., Рыбаков Е.Г., Шельгин Ю.А. Молекулярно-генетические аспекты наследственной и спорадической форм рака толстой кишки // **Клиническая лабораторная диагностика.** 2013. № 9. С. 30-31.

35. **Цуканов А.С.**, Шубин В.П., Поспехова Н.И., Сачков И.Ю., Нагоева Н.М., Кузьминов А.М., Фролов С.А., Кашников В.Н., Шельгин Ю.А. Молекулярная диагностика ослабленной формы семейного аденоматоза толстой кишки у российских пациентов // Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика - 2014». 2014. Т. 2. С.104.

36. Поспехова Н.И., Шубин В.П., **Цуканов А.С.**, Фролов С.А., Шельгин Ю.А. Молекулярно-генетические маркеры в онкоколопроктологии // **Клиническая лабораторная диагностика.** 2014. №9. С. 46-47.

37. **Цуканов А.С.**, Шубин В.П., Поспехова Н.И., Сачков И.Ю., Кузьминов А.М., Ачкасов С.И., Рыбаков Е.Г., Фролов С.А., Кашников В.Н., Шельгин Ю.А. Применение метода секвенирования «нового поколения» в исследовании наследственных форм колоректального рака // **Колопроктология.** 2014. Приложение №3. С. 84.

38. Семенов Д.А., **Цуканов А.С.**, Ачкасов С.И., Шубин В.П., Поспехова Н.И. Скрининг и некоторые клинические особенности синдрома Линча в практике специализированного онкопроктологического стационара // **Колопроктология.** 2014. Приложение №3. С. 75.

39. Шубин В.П., **Цуканов А.С.**, Сачков И.Ю., Ачкасов С.И., Шельгин Ю.А., Кашников В.Н., Фролов С.А., Поспехова Н.И. Некоторые молекулярно-генетические особенности синдрома Линча в России // Сборник трудов IV международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». 2014. С. 211.

40. Ачкасов С.И., **Цуканов А.С.**, Семенов Д.А., Шубин В.П., Поспехова Н.И. Синдром Линча в практике колопроктологического стационара // **Колопроктология.** 2015. Приложение №1. С. 60.

41. **Цуканов А.С.**, Поспехова Н.И., Сачков И.Ю., Кузьминов А.М., Ачкасов С.И., Фролов С.А., Кашников В.Н., Шельгин Ю.А., Шубин В.П. Применение высокопроизводительного секвенирования в исследовании наследственных форм колоректального рака // Сборник трудов Всероссийской научно-практической конференции «NGS в медицинской генетике». 2016. С. 29.

42. Семёнов Д.А., **Цуканов А.С.**, Поспехова Н.И., Шубин В.П., Варданын А.В., Ачкасов С.И., Шельгин Ю.А. Клинико-генетические характеристики российских пациентов с синдромом Линча // Евразийский онкологический журнал. 2016. Т. 4. № 2. С. 248.

43. Кузьминов А.М., Вышегородцев А.М., Савельева Т.А., Поспехова Н.И., Цуканов А.С. Лечебная тактика у пациентов с ослабленной формой семейного аденоматоза толстой кишки // **Колопроктология**. 2016. Приложение №1. С. 96-97.

44. **Цуканов А.С.**, Шельгин Ю.А., Кашников В.Н., Шубин В.П. «Исследование наследственных форм рака толстой кишки с помощью метода секвенирования нового поколения». Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика - 2017». 2017. Т. 2. С. 315.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ВДА – высокодифференцированная аденокарцинома
 Восх. – восходящая ободочная кишка
 ДИ – доверительный интервал
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
 кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
 КТ- компьютерная томография
 мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
 МРТ – магнитно-резонансная томография
 МСН – микросателлитная нестабильность
 МСН-опухоли – опухоли с микросателлитной нестабильностью
 МСС-опухоли – опухоли с микросателлитной стабильностью
 НДА – низкодифференцированная аденокарцинома
 Нисх. – нисходящая ободочная кишка
 ОГМ – опухоль головного мозга
 ОПЗ – отрицательная прогностическая значимость
 ПААГ – полиакриламидный гель
 п.н. – пара нуклеотидов
 ПОК – поперечная ободочная кишка
 ППЗ – положительная прогностическая значимость
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 РЖ – рак желудка
 РМЖ – рак молочной железы
 Рмочет. – рак мочеочника
 РМП – рак мочевого пузыря
 РПЖ – рак поджелудочной железы
 РПоч. – рак почки
 РПр.Ж – рак предстательной железы
 РСЖ – рак сальных желез
 РТК – рак толстой кишки
 РТМ – рак тела матки
 РЩЖ – рак щитовидной железы
 РЯ – рак яичников
 САТК – семейный аденоматоз толстой кишки
 Сигм. – сигмовидная кишка
 УДА – умеренно дифференцированная аденокарцинома
 УЗИ – ультразвуковое исследование
 ЭГДС – эзофагогастродуоденоскопия
 CSGE – Conformation Sensitive Gel Electrophoresis (конформационно - чувствительный электрофорез)
 HGMD – Human Gene Mutation Database (база данных мутаций человека)
 HR – Hazard ratio (отношение рисков)
 InSiGHT – International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors (международное общество по изучению желудочно-кишечных наследственных опухолей)
 MMR – MisMatch Repair system (система репарации неспаренных оснований)
 NGS – Next-Generation Sequencing (секвенирование нового поколения)
 OR – Odds ratio (отношение шансов)
 Sens – Sensitivity (чувствительность)
 Spes – Specificity (специфичность)
 SSCP – Single-Stranded Conformation Polymorphism (метод анализа однонитевого конформационного полиморфизма)