

© Лозинська М. Р., *Плавські А., Чорна Л. Б., **Лозинська Л. Ю., Маркевич Н. В.

УДК 616.345-056.7-07:616-006.5-031.81:575.224.2

*Лозинська М. Р., *Плавські А., Чорна Л. Б., **Лозинська Л. Ю., Маркевич Н. В.*

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ РАННЬОЇ МАНІФЕСТАЦІЇ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКУ ПРИ ДЕЯКИХ МОНОГЕННИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ КИШЕЧНИКА

ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України» (м. Львів)

***Інститут Генетики людини Польської Академії Наук (м. Познань)**

****Національний медичний університет ім. Данила Галицького
(м. Львів)**

Робота виконана згідно з планом НДР «Генетичні підходи до ранньої діагностики та прогнозування виникнення новоутворень при спадкових захворюваннях товстої кишки», № держ. реєстрації 0106U003552.

Вступ. Одним із найбільш частих злویасних новоутворень для осіб обох статей визнано коло-ректальний рак (КРР), ключову роль у виникненні і прогресуванні якого відіграють генетичні чинники. Встановлено, що у виникненні синдромів аденоматозного і гамартомного поліпозу кишечника також активно залучені генетичні механізми [4]. Однак, незважаючи на це, роль спадковості на їх основі у розвитку КРР вивчена недостатньо, а в Україні генетичних досліджень у цьому напрямку не проводилося. Моногенні захворювання кишечника – сімейний аденоматозний поліпоз (САП) і його варіанти та синдроми гамартомного поліпозу відносять до рідкісних, частота яких становить від 1:10000 до 1:250000 новонароджених, однак ступінь пенетрантності більшості з них та ризик виникнення КРР наближається до 100% [3, 2]. Синдроми зумовлюються гетерогенним спектром точкових мутацій, що створює проблеми для молекулярно-генетичної діагностики [5]. Це підтверджує актуальність дослідження мутацій генів, які призводять до виникнення спадкових новоутворень у молодому віці. Зокрема, важливе значення у розумінні генетичної природи виникнення КРР має виявлення і дослідження спектру мутацій генів *APC* та *MUT* при множинному аденоматозному поліпозі та гена *STK11* при гамартомному поліпозі – синдромі Пейтца-Єгерса (СПЕ) [2].

Метою роботи було дослідити спектр мутацій генів *APC*, *MUT* і *STK11* у сім'ях пробандів із аденоматозним і гамартомним поліпозом із раннім виникненням КРР та виявити групи ризику серед близько споріднених родичів пробандів.

Об'єкт і методи дослідження. Протягом 2007-2013 років проведено клінічне обстеження, генеалогічний аналіз та молекулярно-генетичне дослідження зразків ДНК хворих на аденоматозний і гамартомний поліпоз кишечника, ускладнений КРР. Пацієнти були мешканцями Львівської та

Івано-Франківської областей України. Діагноз був підтверджений за допомогою загально-клінічного, ендоскопічного, променевого та лабораторного методів дослідження. Молекулярно-генетичне дослідження зразків крові провели 31 пацієнтам із множинним аденоматозним поліпозом із кількістю поліпів наближеною до 100 і більше (25 пробандів і 6 – близько споріднених родичів) та 4 пацієнтам із синдромом СПЕ (3 пробанди і 1 родич). Серед пацієнтів із аденоматозним поліпозом чоловіків було 14, а жінок – 17 осіб. Вік хворих становив від 14 до 48 років. Пробанди із СПЕ мали вік від 16 до 34 років, двоє з них були жіночої статі. Перед заборою крові для молекулярно-генетичних досліджень від кожного пацієнта отримали інформовану згоду на виконання цього аналізу.

Для визначення мутацій генів *APC*, *MUT* і *STK11* використовували полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), скринінгові методи пошуку невідомих точкових мутацій: гетеродуплексний аналіз (HD) та конформаційний поліморфізм однострочної ДНК (SSCP). Для отримання характеристики мутацій проводили секвенування продуктів ПЛР. Геному ДНК виділяли з периферійної крові використовуючи метод висолування. Застосували праймери, що включали індивідуальні екзонсплайсингові сайти [6]. Ампліфіковані фрагменти гена *APC* перевіряли на наявність мутацій із використанням HD аналізу та SSCP. Фрагменти ДНК, що формували гетеродуплекс під час проведення HD чи відмінні варіанти SSCP, підлягали прямому секвенуванню продукту ПЛР із застосуванням секвенатора ABI 3700, згідно з інструкцією виробника. Найчастіші мутації гена *MUT* виявляли шляхом аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ). Фрагменти ДНК екзонів 7 і 13 гена *MUT* ампліфікували шляхом ПЛР. Ампліфікований продукт екзону 7 обробляли ендонуклеазою MwoI. Продукт ПЛР екзона 13 (242 п. н.) гена *MUT* обробляли рестриктазою BglIII із утворенням двох сайтів рестрикції 82 п. н. і 160 п. н. Продукти ферментативної рестрикції розділяли в 3%-ому агарозному гелі і візуалізували з допомогою бромистого етидію. Делеції гена *STK11* великого

Спектр мутацій генів APC, MYH і STK11 у пробандів та їх родичів із множинним поліпозом товстої кишки, ускладненим колоректальним раком у молодому віці

№ сімей	ПІП пробандів/ вік виявлення КРР (у роках)	Спектр мутацій досліджуваних генів / кількість осіб з обстежених сімей, яким провели ДНК-діагностику/ кількість хворих на поліпоз у межах сім'ї	Кількість хворих на КРР у межах сім'ї	Вік встановлення діагнозу КРР у (у роках)
Хворі на САП				
1	САС / 36	с. 3343delA p. R1114fs (codon 1114) (exon 15) / (3) / 7	6	34,5 (26-43)
2	ВММ / 24	с. 3931_3946delATTGGAAGTAGGTCAG (exon 15) / (1) / 1	1	24,0
3	ГТП / 32	с. 2021T>TAG (codon 674 TTG>TAG) (exon 15) / (2) / 6	5	33,5 (27-40)
4	ТНЯ / (-)	Делеція (exons 11,12,13,14) / (1) / 3	1	28,0
5	ЮГМ / (-)	Мутація сайту сплайсингу: с. 532-1G>A (exon 5) / (1) / 2	1	48,0
Хворі на МУН- поліпоз				
6	ДОН / 40	с. 1187G>A; p. Gly396Asp Подвійні мутації гена MYH G382D і R231H у гетерозиготному стані // (1) / 2	1	40,0
7	ГВВ / (-)	с. 536A>G; p. Tyr179Cys Місенс-мутація гена MYH Y165C у гетерозиготному стані / (2) / 1	1	43,0
Хворі на синдром Пейтца-Єгерса				
8	ММВ / (-)	Делеція (exons 1,2,3) / (2) / 5	1	38,0
9	ВУМ / 28	с. 493G>T, p. Glu165X (codon 165) (exon 4) / (2) / 1	1	28,0

розміру виявляли за допомогою методу мультилокусної лігазної пробозалежної ампліфікації (MLPA). Для виявлення змін малих послідовностей використовували автоматизований метод скринінгу шляхом аналізу кривих плавлення ампліконів із високою роздільною здатністю – (HRM)[2].

Результати досліджень та їх обговорення. На основі ДНК-діагностики у 11(44%) з обстежених пробандів із множинним аденоматозним поліпозом було встановлено САП із автосомно-домінантним типом успадкування. Мутації гена APC визначено у 7 (63,6%) пробандів із 11 сімей, з яких у 6 (85,7%) діагностували випадки КРР. У 2-х пробандів із цих сімей без виявлених мутацій гена APC встановлено МУН-пов'язаний поліпоз. КРР у віці 40 років розвинувся у пробанда – носія подвійної мутації гена MYH. У всіх пробандів із СПЕ і обстеженого родича були підтверджені мутації гена STK11. КРР у молодому віці діагностовано в одного з 3-х пробандів із СПЕ. Результати дослідження спектру мутацій генів APC, MYH і STK11 у пробандів та їх близько споріднених родичів із множинним аденоматозним та гамартомним поліпозом із ускладненням колоректальним раком у молодому віці (менше 50 років) наведено у **таблиці**.

Найбільшу кількість хворих на КРР серед носіїв мутацій гена APC було виявлено у двох сім'ях – №1 і №3 (**табл.**). У 5 (71,4%) пробандів із САП рак розвинувся у віці менше 40 років. У сім'ї №1, в якій успадкування САП спостерігали у 4-х поколіннях, виявили мутацію – делецію одного нуклеотида, що призвела до зсуву рамки читування. Згідно з літературними даними більшість спадкових мутацій при САП найчастіше представлені делеціями 1-5 пар

основ (50%) [3, 5]. У пробанда (САС) у віці 35 років діагностували первинно-множинний рак із локалізацією у сигмоподібній, поперечно-ободовій та сліпій кишці, а у рідного брата у віці 43 років розвинулася аденокарцинома сигмоподібної кишки і інтрамедулярний рак печінки. У сина пробанда на ґрунті САП у віці 26 років розвинувся КРР. У пробанда та його родичів із поліпозом виявили позакишкові пухлинні захворювання: поліпи шлунка, остеоми, фіброми, десмоїдні пухлини.

У жінки-пробанда (ГТП) сім'ї №3 (**табл.**) було встановлено діагноз – рак сигмоподібної кишки (T4NxM1G1) на ґрунті САП у віці 32 роки. У 5 членів цієї сім'ї у 3-х поколіннях діагностовано КРР, а у 2-х із них виявлено маркерну мутацію гена APC с. 2021T>TAG, зумовлену заміною в кодоні 674 TTG>TAG, що спричиняє передчасну термінацію трансляції. Син пробанда помер у віці 29 років від раку прямої кишки (pT4N1M1G1) (захворів у віці 27 років), а брат – у віці 33 роки. У рідної сестри пробанда діагностували САП, фіброми та остеому щелепи у віці 45 років.

У жінки-пробанда (ВММ) сім'ї №2 (**табл.**) на ґрунті САП у віці 24 роки встановили діагноз первинно-множинний РТК наступної локалізації: селезінковий кут, ободова і пряма кишки. Пацієнтка виявилася носієм мутації гена APC, що виникла de novo і була зумовлена делецією 16 нуклеотидів: с. 3931_3946delATTGGAAGTAGGTCAG. У двох пробандів із САП молодого віку – (ЮГМ), носія мутації гена APC у сайті сплайсингу, та (ТНЯ) із мутацією, що призвела до делеції 4-х екзонів, КРР діагностували у родичів у віці менше 50 років (**табл.**). Таким чином,

середній вік виявлення КРР у сім'ях пробандів, носіїв мутації гена *APC*, становив 33,6 років.

Біалельні мутації *G382D* і *R231H* гена *MYH* було виявлено у 2-ох сибсів чоловічої статі без ознак хвороби у батьків (сім'я №6), що вказує на автосомно-рецесивний тип успадкування. У пробанда у віці 40 років розвинувся РТК, а у рідного брата віком 37 років були виявлені множинні аденоматозні поліпи. За даними літератури ризик виникнення РТК у носіїв подвійних *MYH*-мутацій значно перевищує загальнопопуляційний [1].

У 3-х пробандів і одного родича з СПЕ були підтверджені мутації гена *STK11* в екзонах 1, 2, 3 і 4, що призводили до вкорочення білків і втрати кіназної активності. У одного з них – пробанда (ВУМ), носія нонсенс-мутації у 4-му екзоні, розвинувся КРР у віці 28 років (№5, **табл.**). За даними літератури таку ж мутацію було зареєстровано в одного пацієнта з Польщі [2]. У жінки було виявлено множинні поліпи шлунка, тонкої кишки і різних відділів товстої кишки. У дочки пробанда маркерної мутації не підтверджено.

Висновки.

1. Середній вік виявлення КРР у сім'ях пробандів із САП, носіїв мутації гена *APC*, становив 33,6 років, а найменший вік виникнення КРР діагностували у віці 24 роки у пробанда з мутацією, що виникла де

ново і була зумовлена делецією 16 нуклеотидів. У більшості хворих молодого віку КРР, що розвинувся на ґрунті САП, був первинно-множинним чи/і супроводжувався позакишковими пухлинними захворюваннями.

2. Найбільшу кількість хворих на КРР молодого віку серед хворих на САП виявлено у 4-х поколіннях сім'ї, носіїв мутації гена *APC*, зумовленої делецією одного нуклеотида, що призвела до зсуву рамки читування.

3. Пацієнти з аденоматозним поліпозом, у яких підтверджено біалельні мутації *G382D* і *R231H* гена *MYH*, є групою ризику виникання КРР у молодому віці.

4. Найменший вік маніфестації КРР при СПЕ діагностували у носія мутації гена *STK11*, що зумовлена заміною нуклеотидів с. 493G>T, р. Glu165X у 4-му екзоні.

Перспективи подальших досліджень. Пацієнти з різними генетичними формами поліпозу потребують диференційованого підходу під час генетичного консультування. У даному контексті вивчення спектру мутацій генів *APC*, *MYH*, *STK11* залишається важливою проблемою для сучасних досліджень в Україні, що спрямована на в'яснення того, які з них залучені в колоректальний канцерогенез у осіб молодого віку.

Література

- Balaguer F. Identification of *MYH*-mutation carriers in colorectal cancer: a multi center, case-control, population-base study / F. Balaguer, S. Castelvi-Bel, A. Castells [et al.] // Clin. Gastroenterol. Hepatol. – 2007. – Vol. 5(3). – P. 579-587.
- Borun P. High resolution melting analysis as a rapid and efficient method of screening and small mutations in the *STK11* gene in patients with Peutz-Jeghers syndrome / P. Borun, A. Bartkowiak, T. Banasiewicz [et al.] // BMC Medical genetics. – 2013. – Vol. 14(58). – P. 2-7.
- Delaini G. G. Intestinal polyps and polyposis. From genetics to treatment and follow up / G. G. Delaini, T. Skřička, G. Colucci. – Italia : Springer-Verlag, 2009. – 243 p.
- Gryfe R. Clinical implications of our advancing knowledge of colorectal cancer genetics: inherited syndromes, prognosis, prevention, screening and therapeutics / R. Gryfe // Surg. Clin. North Am. – 2006. – Vol. 86(4). – P. 787-817.
- Kerr S. E. APC germline mutations in individuals being evaluated for familial adenomatous polyposis: a review of the Mayo clinic experience with 1591 consecutive tests / S. E. Kerr, C. B. Thomas, S. N. Thibodeau [et al.] // J. Mol. Diagn. – 2013. – Vol. 15(1). – P. 31-43.
- Miyoshi Y. Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients // Y. Miyoshi, H. Ando, H. Nagase [et al.] // Proc Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol. 89. – P. 4452-4456.

УДК 616.345-056.7-07:616-006.5-031.81:575.224.2

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ РАНЬОЇ МАНІФЕСТАЦІЇ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКУ ПРИ ДЕЯКИХ МОНОГЕННИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ КИШЕЧНИКА

Лозинська М. Р., Плавські А., Чорна Л. Б., Лозинська Л. Ю., Маркевич Н. В.

Резюме. Виконано клінічне обстеження та молекулярно-генетичне дослідження зразків ДНК хворих із моногенними синдромами аденоматозного і гамартомний поліпозу кишечника, мешканців України. Визначено спектр мутацій генів *APC*, *MYH* і *STK11* у пробандів і групі ризику з поліпозом, ускладненим колоректальним раком у молодому віці. Середній вік виявлення раку у сім'ях пробандів із сімейним аденоматозним поліпозом, носіїв мутації гена *APC*, становив 33,6 років. Найменший вік маніфестації раку при синдромі Пейтца-Єгерса діагностували у носія мутації гена *STK11*, що зумовлена заміною нуклеотидів с. 493G>T, р. Glu165X у 4-му екзоні.

Ключові слова: сімейний аденоматозний поліпоз, спектр мутацій, гамартомний поліпоз, колоректальний рак.

УДК 616.345-056.7-07:616-006.5-031.81:575.224.2

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РАННЕЙ МАНИФЕСТАЦИИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА ПРИ НЕКОТОРЫХ МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА

Лозинская М. Р., Плавски А., Чорна Л. Б., Лозинская Л. Ю., Маркевич Н. В.

Резюме. Проведено клиническое обследование и молекулярно-генетическое исследование образцов ДНК больных из моногенными синдромами аденоматозного и гамартomatного полипоза кишечника, жителей Украины. Определено спектр мутаций генов *APC*, *MYH* и *STK11* у пробандов и группе риска с полипозом, усложненным колоректальным раком в молодом возрасте. Средний возраст выявления рака в семьях пробандов с семейным аденоматозным полипозом, носителей мутаций гена *APC*, составлял 33,6 лет. Наименьший возраст манифестации колоректального рака при синдроме Пейтца-Егерса диагностировали у носителя мутации гена *STK11*, которая обусловлена заменой нуклеотидов с. 493G>T, p. Glu165X в 4-м экзоне.

Ключевые слова: семейный аденоматозный полипоз, спектр мутаций, гамартomatный полипоз, колоректальный рак.

UDC 616.345-056.7-07:616-006.5-031.81:575.224.2

The Molecular Genetic Markers of Early Manifestation of Colorectal Cancer in Some Monogenic Disorders of Intestine

Lozynska M.R., Plawski A., Chorna L.B., Lozynska L.Yu., Markevich N.V.

Abstract. Colorectal cancer (CRC) is one of the most frequent malignant neoplasia in individuals of both sexes. Genetic alterations play a significant role in the development of all colorectal malignancies, including adenomatous and hamartomatous polyposis. The incidence of the monogenic diseases of small and large intestine – familial adenomatous polyposis (FAP) and syndromes of hamartomatous polyposis, has been estimated to be approximately 1:10,000 – 1:250000 in newborns with approximately to 100% penetrance. The majority of patients with these disorders will develop CRC due to the vast number and early onset of polyps.

The aim of the study was to investigate the spectrum of mutations of the *APC*, *MYH* and *STK11* genes in the families of probands with adenomatous and hamartomatous polyposis with early age of CRC manifestation and was found out the risk group among the relatives of the probands.

The genealogic analysis, molecular and clinical investigations has been carried out in patients from Ukraine with some monogenic syndromes of intestine. Genomic DNA was extracted from peripheral blood cells. The *APC* and *STK11* genes amplified fragments were screened for mutations involving the heteroduplex analysis (HD) and single-strand conformational polymorphism (SSCP) methods. The mutations of *APC* and *STK11* genes were identified using automatic DNA sequencer. The small sequence changes within the examined fragments in the *STK11* gene was detected using the high resolution melting (HRM) analysis. To detect deletions of one or more exons multiplex ligation dependent probe amplification technique (MLPA) was also used. The most common mutations of *MYH* gene were screened by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses.

This article summarizes the genetics, clinical manifestations of each of these syndromes and an emphasis on genetic testing and young age of cancer onset in patients carried mutations. The marked mutations of *APC* gene were detected in 7(63.6%) of probands with FAP. The greatest quantity of patients with early manifestation of CRC, carried the mutations of *APC* gene, was observed in family the proband with the deletion of one nucleotide, caused by a frameshift mutation. The average age of CRC onset in patients carried *APC* mutations is 33.6 years. The youngest age of CRC onset was diagnosed in proband carried mutation, caused by the deletion of 16 nucleotides. Multiply colon cancers and malignancies outside the gastrointestinal tract occur at an increased frequency in this group of patients. Soft tissue tumors and osteomas were also found in the group of patients carried *APC* gene mutations.

Patients with multiply adenomas who do not exhibit an autosomal dominant pattern of inheritance of polyposis carried biallelic mutations in the *MYH* gene were a risk group of young age of CRC onset. The youngest age of CRC manifestation in patients with hamartomatous polyposis – Peutz-Jeghers syndrome (PJS), was diagnosed in proband with *STK11* gene mutation с. 493G>T, p. Glu165X in 4 exon. Early identification of *APC*, *MYH* and *STK11* gene mutations and intervention can dramatically reduce the risk of malignancy in patients with monogenic cancer syndrome of intestine.

Key words: familial adenomatous polyposis, gene mutations, hamartomatous polyposis, colorectal cancer.

Рецензент – д. біол. н. Макух Г. В.

Стаття надійшла 30. 05. 2014 р.