

КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАСЛЕДСТВЕННОГО РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ. СЕМЕЙНЫЙ АДЕНОМАТОЗНЫЙ ПОЛИПОЗ

Ефимова И.Ю., Геворкян Ю.А., Солдаткина Н.В., Милакин А.Г.

ФБГУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: rnioi@list.ru

Рак толстой кишки (РТК) относится к наиболее распространенным онкологическим заболеваниям. Генетические факторы оказываются значимыми в 15–30 % случаев. Одной из основных наследственных причин РТК является семейный аденоматозный полипоз (САП). Без лечения к 40 годам у таких пациентов обычно развивается РТК. Поэтому молекулярно-генетическое исследование наследственных форм колоректального рака необходимо как для самих пациентов в целях индивидуализации лечения, так и для их кровных родственников для формирования групп риска развития рака толстой кишки. САП – аутосомно-доминантный синдром, развивающийся вследствие герминальных мутаций в гене *APC*. Целью настоящего исследования стало определение спектра мутаций гена *APC* у пациентов, проживающих на Юге России и проходивших диагностику и лечение на базе ФГБУ «РНИОИ». В исследование вошли 7 пациентов с клинической картиной аденоматозного полипоза и 12 кровных родственников. Два пациента не имели семейного отягощенного анамнеза по САП. Молекулярно-генетическое исследование включало выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови пациентов, амплификацию экзонов гена *APC* и прямое секвенирование ампликонов по методу Сэнгера. В исследуемой группе больных было выявлено пять пациентов с герминальной мутацией в гене *APC*, что составило 71,4 %. Обнаружены следующие мутации: три вида нонсенс-мутаций - 847C>T (p.Arg283Term), c.2362A>T (p.Lys788Term) и c.2365C>T (p.Gln789Term), мутация сайта сплайсинга - c.1744-2A>G, делеция - 1309del5 (c.3927_3931delAAAGA). Наследственные мутации обнаружены у четырех кровных родственников пациентов. Проведено медико-генетическое консультирование, даны рекомендации.

Ключевые слова: семейный аденоматозный полипоз, MUTYH-ассоциированный полипоз, рак толстой кишки, герминальные мутации.

CLINICAL AND GENETIC ASPECTS OF HEREDITARY COLORECTAL CANCER. FAMILIAL ADENOMATOUS POLYPOSIS

Efimova I.Yu., Gevorkyan Yu.A., Soldatkina N.V., Milakin A.G.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: rnioi@list.ru

Colon cancer is one of the most common oncological diseases. Genetic factors are significant in 15-30% of cases. One of the main hereditary causes of colorectal cancer is familial adenomatous polyposis (FAP). Without treatment by the age of 40, these patients usually develop cancer. Therefore, a molecular genetic study of hereditary forms of colorectal cancer is necessary both for the patients themselves for the individualization of treatment and for their relatives to form risk groups for developing colon cancer. FAP is an autosomal dominant syndrome that develops as a result of germinal mutations in the *APC* gene. The purpose of this study was to determine the spectrum of mutations in the *APC* gene in patients residing in the South of Russia and who underwent diagnostics and treatment on the basis of the RNIOL. The study included 7 patients with a clinical picture of adenomatous polyposis and 12 blood relatives. Two patients did not have a family history. Molecular genetic research included the isolation of DNA from peripheral blood leukocytes of patients, amplification of exons of the *APC* gene and direct sequencing of amplicons by the Sanger method. In the study group of patients, five patients with a germinal mutation in the *APC* gene were identified, which was 71.4%. The following mutations were found: three types of nonsense mutations - 847C>T (p.Arg283Term), c.2362A>T (p.Lys788Term) and c.2365C>T (p.Gln789Term), mutation of splice site - p.1744-2A>G, deletion - 1309del5 (c.3927_3931delAAAGA). Hereditary mutations were found in four blood relatives of patients. Medical and genetic counseling was conducted, and recommendations were made.

Keywords: Familial adenomatous polyposis, MUTYH-associated polyposis, colorectal cancer, germinal mutations.

Рак толстой кишки (РТК) относится к наиболее распространенным онкологическим заболеваниям [1]. Для РТК характерны высокие темпы роста заболеваемости и смертности,

сохраняющиеся на протяжении последних десятилетий. Ежегодное число заболевших РТК во всём мире близится к 1,5 миллионам человек. В 2012 году зарегистрировано 1 млн 360 тыс. человек. В России показатель распространенности злокачественными новообразованиями в 2016 г. составил 2 403,5 на 100 000 населения, что выше уровня 2006 г. (1 730,9) на 38,8 % [2]. В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями в России рак толстой кишки занимает 4-е место. В 2016 г. в РФ из взятых на учет 530509 больных с впервые установленным диагнозом злокачественные новообразования (ЗНО), 60275 пришлось на колоректальный рак, что составило 11,3 % [2]. С 2005 по 2015 г. в России абсолютный прирост заболеваемости раком толстой кишки составил 26,09 %. В структуре смертности населения РФ от злокачественных новообразований удельный вес рака ободочной кишки составляет 7,9 %, прямой кишки – 5,7 % [2].

В большинстве случаев рак толстой кишки носит спорадический характер. Генетические факторы оказываются значимыми в 15–30 % случаев. Однако только около 5 % всех форм колоректального рака развивается на фоне хорошо известных наследственных синдромов, таких как синдром Линча (наследственный неполипозный рак толстой кишки, ННПРТК), семейный аденоматозный полипоз (САП) и MUTYH-ассоциированный полипоз (МАП) [3].

Семейный аденоматозный полипоз (САП) – тяжелое аутосомно-доминантное заболевание, развивающееся в гене *APC* (Adenomatous Polyposis Coli). Частота встречаемости данного синдрома колеблется от 1 на 6800 до 1 на 29000 человек [4]. Около 1 % от всех случаев рака толстой кишки связывают САП, который характеризуется преимущественным поражением толстой кишки множественными аденоматозными полипами и высоким индексом их малигнизации (до 100 %) [5]. Количество полипов толстой кишки может варьировать. Сотни и тысячи полипов характерны для классической формы заболевания, менее 100 для аттенуированной [6].

Мутации *APC* гена обнаруживаются в 80–90 % случаев классического САП и в 10-30 % аттенуированного САП (АСАП) [7]. Следует отметить, что олигополипоз может быть проявлением также и биаллельной мутации гена *MUTYH* [8]. *APC* является геном-супрессором опухолевого роста. Он играет ключевую роль в работе wnt-сигнального пути, участвуя в деградации β -катенина в цитоплазме клеток. Мутации, изменяющие структуру белка APC, приводят к нарушению работы деградирующего комплекса (GSK3 β , актин-1 и APC) и увеличению концентрации β -катенина. В результате накапливающийся в цитоплазме свободный β -катенин проникает в ядро и активирует транскрипцию некоторых генов и онкогенов, контролирующих клеточный рост и деление [9].

APC-ген расположен на длинном плече пятой хромосомы (5q21-22). Состоит из 8535 пар оснований, организованных в 15 кодирующих экзонов. Белок содержит 2843 аминокислотных остатка. Мутации в *APC* впервые были описаны в 1991 году и сегодня известно более 600 вариантов. Наиболее частыми являются мутации, приводящие к синтезу укороченного белка *APC*: это мутации со сдвигом рамки считывания (68 %), нонсенс мутации (30 %), крупные делеции (2 %). Горячие точки гена локализованы в 1309 и 1061 кодонах, частота мутаций в которых составляет 17 % и 11 % соответственно [10]. Примерно у 10–30 % заболевание развивается вследствие мутации *de novo* [11,12].

Целью настоящего исследования стало определение спектра мутаций гена *APC* у пациентов, проживающих на Юге России и проходивших диагностику и лечение на базе ФГБУ «РНИОИ».

Материалы и методы

Поиск наследственных мутаций проводился у 7 пациентов с клиническими признаками семейного аденоматозного полипоза (САП) и у всех больных изучался семейный анамнез.

У пяти пациентов наблюдалась классическая форма САП, характеризующаяся тысячами полипов на протяжении всей толстой кишки, а у двоих – аттенуированная форма с менее чем 30 колоректальными аденомами. Выделение геномной ДНК было выполнено из лейкоцитов периферической крови по стандартной методике, используя фенол-хлороформную экстракцию. Концентрацию полученных препаратов ДНК измеряли на флуориметре «Qubit 2.0» (Invitrogen, USA) с помощью набора Quant-iTTMdsDNA и нормализовывали её до 2 нг/мкл. 15 кодирующих экзонов гена *APC* с примыкающими частями интронов (50–100 пар нуклеотидов) амплифицировали методом полимеразной цепной реакции с использованием 23 пар праймеров. В случае аттенуированного полипоза также проводилось исследование 16 кодирующих экзонов гена *MUTYH* с использованием 9 пар праймеров. Далее полученные фрагменты ДНК секвенировали по двум комплементарным цепям с использованием ABI PRISM 3500 (8 capillaries; Applied Biosystems).

Результаты

Средний возраст постановки диагноза составил 31,3 года. Диагноз САП был подтвержден гистологически у всех пробандов. В исследуемой группе больных было выявлено пять пациентов с герминальной мутацией в гене *APC*, что составило 71,4 %. Поиск мутаций был проведен у 12 кровных родственников пациентов. У 4 человек были выявлены аналогичные варианты. Все семьи прошли медико-генетическое консультирование с

рекомендациями по осуществлению пожизненного клинического мониторинга лицам с выявленными мутациями (таблица).

Данные об исследованных пациентах с обнаруженной герминальной мутацией в гене *APC*.

Пациент	Возраст возникновения полипоза	Количество полипов	Мутация	Количество родственников с мутацией
1	22 года	Более 1000 полипов	847C>T(p.Arg283Term)	1 (сын)
2	40 лет	Более 1000 полипов	c.2362A>T(p.Lys788Term)	?
3	28 лет	Более 1000 полипов	c.2365C>T(p.Gln789Term)	0
4	36 лет	Более 1000 полипов	c.1744-2A>G	1 (сын)
5	33 года	Более 1000 полипов	1309del5(c.3927_3931delAAAGA)	2 (брат и племянница)

Четыре пациента имели родственника первой степени родства с аденоматозным полипозом, и у одного пациента с высокой вероятностью мутация возникла *de novo*. У пациентов с аттенуированной формой полипозамутации в генах *APC* и *MUTYH* обнаружены не были. Герминальные мутации были представлены следующими типами: три нонсенс-мутации (60 %), одна делеция (20 %) и одна мутация сайта сплайсинга (20 %): 847C>Tp.Arg283Term), c.2362A>T(p.Lys788Term), c.2365C>T(p.Gln789Term), c.1744-2A>G, 1309del5(c.3927_3931delAAAGA) (рис. 1). Все они приводят к возникновению укороченного белка и, следовательно, являются истинно патогенными. Спектр выявленных мутаций несколько отличается от обнаруженных вариантов мутаций у населения центральной России [13].

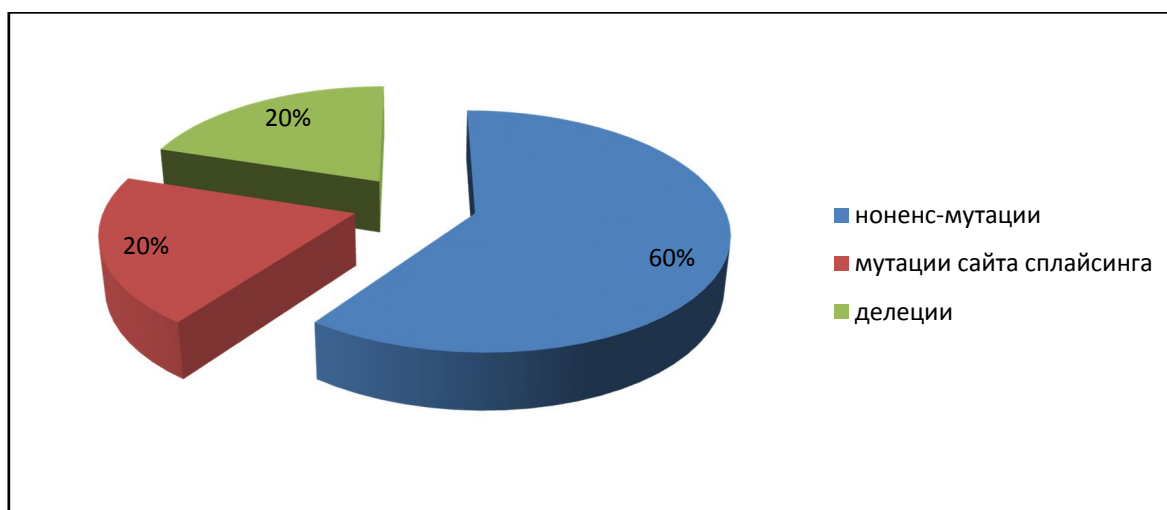


Рис. 1. Частота патогенных мутаций *APC* гена

В качестве примера приводим клиническое описание и анализ родословной одного из пациентов с мутацией 1309del5(c.3927_3931delAAAGA)(рис. 2).

Пробанд К., 33 года, классическая форма САТК. При гистологическом исследовании выявлены тубулярные аденомы толстого кишечника с дисплазией 2 степени эпителия желёз. При колоноскопии обнаружено более тысячи полипов от 0,3 до 3 см во всех отделах толстой кишки. В семье отец Пробанда (II-4) в 36 лет прооперирован по поводу рака толстой кишки на фоне САТК, в 42 года умер. Братья и сестры отца здоровы. Бабушка Пробанда (I-1) умерла в 67 лет от рака почки, дедушка – в 72 года от рака легкого. Брат Пробанда (III-1) в 30 лет прооперирован в РОНЦ РАМН по поводу рака толстой кишки на фоне САТК. Проведено генетическое исследование детей Пробанда и брата. Мутация 1309del5 (рис. 3) выявлена у племянницы Пробанда, 7 мес. (IV-1).

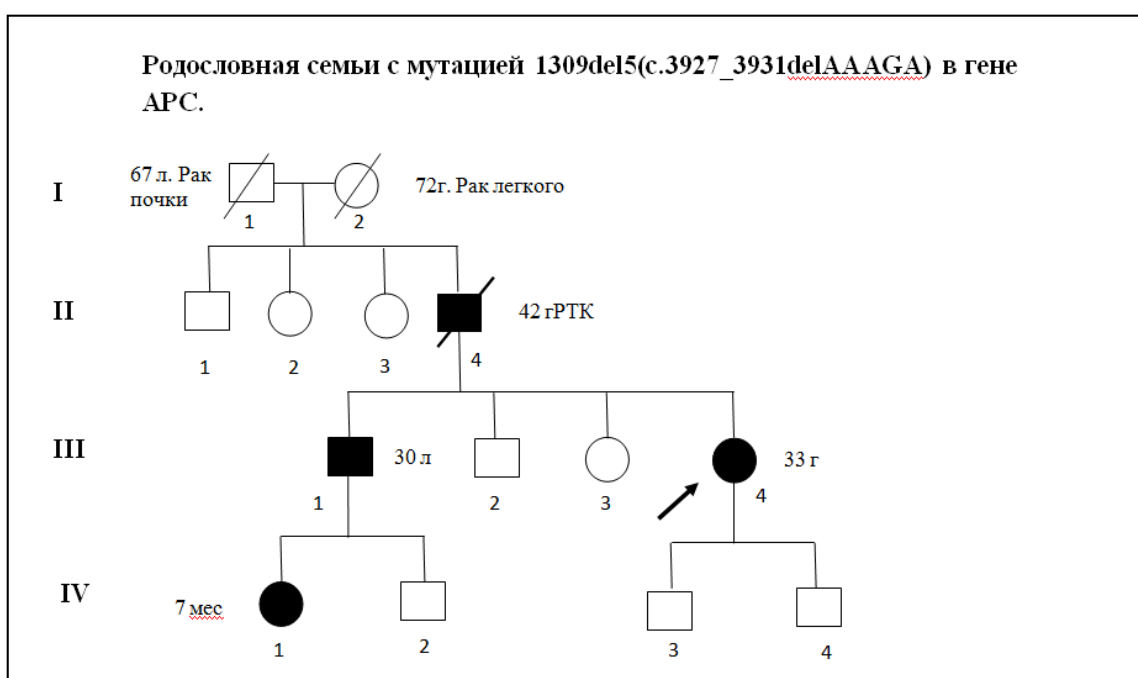


Рис. 2. Родословная семьи с семейным аденоматозным полипозом

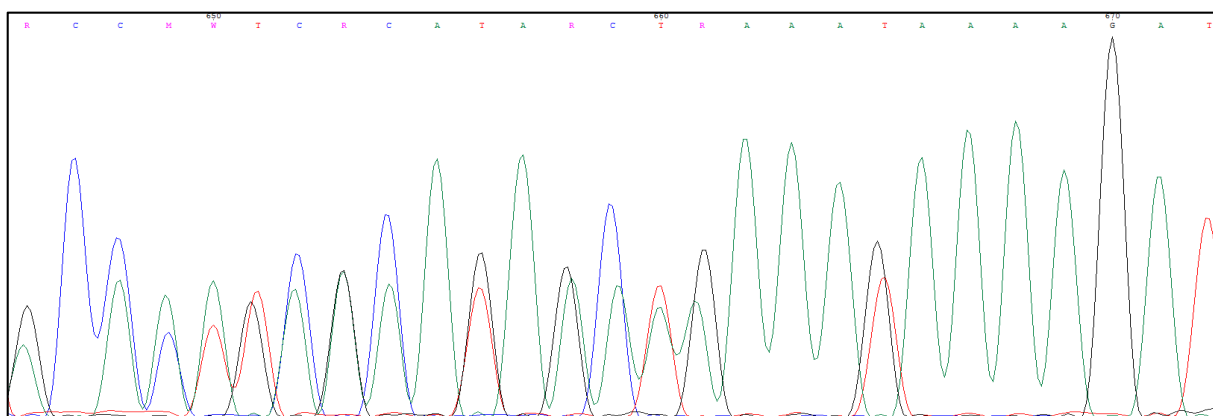


Рис. 3. Сиквенс пациента с мутацией 1309del5(c.3927_3931delAAAGA)

Обсуждение

Поиск мутаций при наследственных опухолевых синдромах позволяет определить тактику хирургического лечения, план последующей диспансеризации больного, а также помогает выявить родственников – носителей мутации. Это имеет важное значение при оценке риска развития злокачественных опухолей еще до клинической манифестации заболевания и способствует реализации стратегии персонализированной медицины и улучшению качества оказания онкологической медицинской помощи. Согласно рекомендациям американского общества по гастроэнтерологии (ACG), индивидуумы, имеющие более 10 колоректальных полипов, с наличием в семейном анамнезе родственника с синдромом полипоза, либо данные об аденомах и внекишечных проявлениях, характерных для САП (аденомы двенадцатиперстной кишки, десмоидные опухоли, папиллярный рак щитовидной железы, врожденная гипертрофия пигментного эпителия сетчатки, эпидермальные кисты, остеомы), должны быть обследованы на наличие синдромов аденоматозного полипоза. Генетическое тестирование включает анализ генов *APC* и *MUTYH*. Лицам, находящимся в группе риска по развитию САП, а также пациентам с уже имеющимися проявлениями САП с целью исключения малигнизации полипов необходимо ежегодное проведение колоноскопии или гибкой ректороманоскопии начиная с пубертата. В семьях с АСАП рекомендовано проведение колоноскопии. Абсолютными показаниями для неотложной колэктомии при САП, АСАП и МАП являются: подтвержденный или предполагаемый рак, либо наличие значимых симптомов злокачественного процесса. Относительные показания к операции включают наличие множественных аденом > 6 мм, увеличение числа аденом и невозможность адекватного обследования толстой кишки из-за множества мелких полипов. Эндоскопия верхних отделов ЖКТ показана пациентам в возрасте 25–30 лет и далее раз в 0,5–4 года в зависимости от стадии дуоденального полипоза по Шпигельману. 0 ст. – раз в 4 года, I ст. – раз в 2-3 года, II ст. – раз в 1-3 года, III ст. – раз в 6–12 мес, IV ст. – хирургическое лечение. Также показано ежегодное УЗИ щитовидной железы. Детям до 7 лет раз в два года следует проводить исследование α -фетопротеина и УЗИ. Послеоперационное наблюдение за пациентами должно включать в себя ежегодную эндоскопию прямой кишки или кармана подвздошной кишки и осмотр илеостомы каждые два года [14]. Согласно рекомендациям Европейского Общества Медицинской Онкологии (ESMO) эндоскопическое обследование при классическом аденоматозном полипозе должно проводиться пожизненно. При бессимптомном носительстве мутации рекомендуется выполнение ректороманоскопии гибким фиброскопом каждые 2 года, начиная с 10–12-летнего возраста. При обнаружении хотя бы одной аденомы колоноскопию в последующем следует проводить ежегодно. Хирургическое лечение показано при большом количестве

аденом, а также при наличии аденом с высокой степенью дисплазии. Эндоскопия верхних отделов ЖКТ проводится с 20–25 лет, либо с момента обнаружения колоректальных аденом. Частота проведения эндоскопии зависит от стадии дуоденального полипоза по Шпигельману. С целью исключения рака щитовидной железы показано ежегодное УЗИ. Диагностика десмоидных опухолей проводится с помощью КТ либо МРТ и может быть показана пациентам с семейным анамнезом, а также при локализации мутации в определенных сайтах гена *APC* [15].

Заключение

Частота возникновения наследственных мутаций в гене *APC* у пациентов с классической формой САТК составила 71,4 %: три нонсенс-мутации (60 %), одна делеция (20 %) и одна мутация сайта сплайсинга (20 %). Полученные результаты указывают на необходимость исследования всех кодирующих экзонов гена *APC* у больных классической (тяжелой) формой семейного аденоматоза толстой кишки, а также обязательное обследование всех кровных родственников больного. При обнаружении мутации можно говорить о чрезвычайно высокой вероятности развития опухолевого синдрома (не менее 80 %) в течение жизни.

Список литературы

1. Кит О.И., Водолажский Д.И. Молекулярная биология колоректального рака в клинической практике / О.И. Кит, Д.И. Водолажский // Молекулярная биология. – 2015. – Т. 49. – № 4. – С. 531-540.
2. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М., 2017. – 250 с.
3. Lodewijk A.A., Brosens G., Johan A., Offerhaus Francis M. Giardiello. Hereditary Colorectal Cancer: Genetics and Screening / A.A. Lodewijk, G. Brosens, A. Johan, Francis M. Offerhaus, Giardiello // Surg Clin North Am. 2015 Oct.; 95(5):1067-80. doi: 10.1016.
4. Petersen G.M., Slack J., Nakamura Y. Screening guidelines and premorbid diagnosis of familial adenomatous polyposis using linkage // Gastroenterology 1991;100(6):1658–1664.
5. Kastrinosand F., Syngal S. Inherited Colorectal Cancer Syndromes // J. Cancer. 2011. 17 (6), pp. 405-415.
6. Talseth-Palmer B.A. The genetic basis of colonic adenomatous polyposis syndromes / B.A. Talseth-Palmer // Hered Cancer ClinPract. 2017 Mar. 16;15:5. doi: 10.1186/s13053-017-0065-x. eCollection 2017.

7. Brosens L.A., van Hattem W.A., et al. Gastrointestinal polyposis syndromes / L.A. Brosens, W.A. van Hattem, M. Jansen // *CurrMol Med.* 2007 Feb.;7(1):29-46.
8. Nielsen M., Hes F.J., Nagengast F.M., et al. Germline mutations in APC and MUTYH are responsible for the majority of families with attenuated familial adenomatous polyposis / M. Nielsen, F.J. Hes, F.M. Nagengast // *Clin Genet* 2007;71:427–33.
9. Yingzi Yang. Wntsignaling indevelopment and disease / Yang Yingzi // *CELL & BIOSCIENCE*, 2(1), 14,2012. DOI: 10.1186/2045-3701-2-14.
10. Wachsmannova-Matelova L., Stevurkova V., Adamcikova Z., Holec V., Zajac V. Different phenotype manifestation of familial adenomatous polyposis in families with APC mutation at codon 1309 / L. Wachsmannova-Matelova, V. Stevurkova, Z. Adamcikova, V. Holec, V. Zajac // *Neoplasma.* 2009;56(6):486-9.
11. Ripa R., Bisgaard M.L., Bülow S. and Nielsen F.C. De novo mutations in familial adenomatous polyposis (FAP) / R. Ripa, M.L. Bisgaard, S. Bülow and F.C. Nielsen // *Eur. J. Hum. Gen.* 2002. Vol.10. P.631–63.
12. Kastrinosand F., Syngal S. Inherited Colorectal Cancer Syndromes / F. Kastrinosand, S. Syngal // *Cancer J.* 2011. 17 (6). P. 405-415.
13. 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. – № 2. – С. 11-15.
14. Syngal S., Brand R.E., Church J.M., Giardiello F.M., Hampel H.L., Burt RWACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes // *Am J. Gastroenterol.* 2015 Feb.;110(2):223-62; quiz 263.
15. Stoffel E.M., Mangu P.B., Gruber S.B., Hamilton S.R., Kalady M.F., Lau M.W., Lu K.H., Roach N., Limburg P.J. American Society of Clinical Oncology; European Society of Clinical Oncology. Hereditary colorectal cancer syndromes: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline endorsement of the familial risk-colorectal cancer: European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines // *J. Clin. Oncol.* 2015 Jan. 10;33(2):209-17.