

Дифференциальный диагноз синдрома Линча от других форм неполипозного колоректального рака среди российских пациентов

А. С. Цуканов, Н. И. Поспехова, В. П. Шубин, И. Ю. Сачков,
С. Н. Жданкина, А. А. Пономаренко, Е. Г. Рыбаков, С. И. Ачкасов,
В. Н. Кашников, С. А. Фролов, Ю. А. Шельгин

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Государственный научный центр колопроктологии» Минздрава РФ

Differentiation of Lynch syndrome from other forms of non-polyposis colorectal cancer among Russian patients

A.S. Tsukanov, N.I. Pospehova, V.P. Shubin, I.Yu. Sachkov, S.N. Zhdankina, A.A. Ponomarenko,
E.G. Rybakov, S.I. Achkasov, V.N. Kashnikov, S.A. Frolov, Yu.A. Shelygin

Federal state-funded institution «State Scientific Center of Coloproctology»
Ministry of healthcare of the Russian Federation

Цель исследования. Синдром Линча — наследственный синдром, вызванный герминальной мутацией в одном из генов репарации неспаренных оснований и обуславливающий высокий риск развития рака толстой кишки. На данный момент нет критериев, позволяющих выявлять всех носителей мутации, и разработка новых рекомендаций продолжается, что и послужило задачей проведенного исследования.

Материал и методы. Поиск микросателлитной нестабильности (МСН), характерной для синдрома Линча, проводился в образцах опухоли 73 пациентов методом фрагментного анализа. При ее выявлении осуществлялся поиск герминальных мутаций методами полимеразной цепной реакции, электрофореза и прямого секвенирования.

Результаты. Микросателлитная нестабильность обнаружена в 17 опухолевых образцах (23%, 17/73). У 9 человек выявлены герминальные мутации, что позволило отнести эту группу к больным с синдромом Линча. Из 9 мутаций 3 описаны впервые в мире.

Aim of investigation. Lynch's syndrome is hereditary syndrome caused by germline mutation in one of reparation genes not coupled bases and causing high risk of colorectal cancer development. At present there are no criteria, allowing to reveal all mutation carriers, and development of new guidelines is still going on, that became a task for original study.

Material and methods. Search of *microsatellite instability* (MSI), characteristic for Lynch's syndrome, was carried out in tumor samples of 73 patients by fragment analysis method. At its detection search of germline mutations by polymerase chain reaction methods, electrophoresis and direct sequencing was carried out.

Results. Microsatellite instability was found out in 17 neoplastic samples (23%, 17 of 73). At 9 person germline mutations that has allowed to attribute this group to patients to Lynch's syndrome were revealed. Three of 9 mutations were described for the first time in the world.

Conclusions. According to neoplastic MSI, age and family history two new criteria for Lynch's syndrome

Цуканов Алексей Сергеевич — кандидат медицинских наук, заведующий кабинетом лабораторной генетики, ФГБУ «ГНЦ колопроктологии» Минздрава РФ. Контактная информация: tsukanov81@rambler.ru; 123423, Москва, ул. Салыма Адилья, д. 2
Tsukanov Alexey S. — MD, head of laboratory genetics study, Federal state-funded institution «State Scientific Center of Coloproctology». Contact information: tsukanov81@rambler.ru; 123423, Moscow, Salyam Adilya street, 2

Выводы. На основании опухолевой МСН, возраста и отягощенности семейной истории были предложены два новых критерия для поиска российских пациентов с синдромом Линча. Эффективность первого критерия составила 60%, второго — 85,7%.

Ключевые слова: синдром Линча, рак толстой кишки, микросателлитная нестабильность, гены MMR, герминальные мутации.

Синдром Линча, известный как «наследственный неполипозный рак толстой кишки», является наследственным заболеванием, вызываемым герминальной мутацией в одном из генов репарации неспаренных оснований, — *mismatch repair* (MMR) [4]. Для данного синдрома характерно, в первую очередь, развитие неполипозного *рака толстой кишки* (РТК), а также рака желудка, яичников и других органов [2]. Предположительно от 1 до 3% всех случаев РТК обусловлено данным синдромом. По некоторым сообщениям, до 1 млн человек в Европе могут иметь мутацию в генах MMR. Указанные гены были описаны в последнее десятилетие прошлого века. К ним относятся: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* [12]. При этом более 90% наследственных мутаций сосредоточено в генах *MLH1*, *MSH2* и *MSH6*. Система MMR устраняет ошибки между некомплементарными основаниями, а также удаляет петли инсерции — делеции, выполняя функции поддержания целостности генома и супрессии опухоли [5].

Наследственная или соматическая инактивация генов системы MMR приводит к возникновению в опухоли *микросателлитной нестабильности* (МСН). Микросателлитная нестабильность встречается более чем в 90% колоректальных опухолей, обусловленных синдромом Линча [9]. Тем не менее, одно только наличие микросателлитной нестабильности не является достаточным диагностическим признаком данного синдрома, так как от 13 до 20% спорадического РТК также могут иметь высокий уровень МСН, в основном вызванный гиперметилированием промоторного участка гена *MLH1* [3].

Описанная клиничко-генетическая картина синдрома Линча является довольно непростой. Как известно, РТК занимает ведущие позиции в структуре онкологических заболеваний (в России только в 2009 г. диагностировано более 57 000 новых случаев [1]), а значит, отбор пациентов с синдромом Линча вызывает большую трудность в связи с невозможностью проведения молекулярно-генетических исследований у всех больных, страдающих РТК. Задача по определению критериев для отбора пациентов, с наибольшей вероятностью имеющих наследственную мутацию в генах MMR, решается уже более 20 лет. Первые

search in the Russian patients have been offered. Efficacy of the first criterion was 60%, that of the second — 85,7%.

Key words: Lynch's syndrome, colorectal cancer, microsatellite instability, genes MMR, germline mutations.

клинические критерии (Амстердамские) для отбора семей с этим синдромом были разработаны в 1991 г. [11]. К ним относятся:

- молодой возраст пациентов при возникновении заболевания (до 50 лет);
- наличие трех или более кровных родственников с морфологически верифицированным РТК;
- заболевание колоректальным раком более чем в 1 поколении;
- не меньше чем один из заболевших должен быть родственником первой степени родства по отношению к остальным двум;
- семейный аденоматоз толстой кишки должен быть исключен.

При этом отобранные пациенты должны соответствовать всем критериям одновременно. Однако даже при таком строгом подходе мутации в генах MMR обнаруживались лишь у половины больных. С ростом накопленных данных критерии сначала дополнялись (1999 г.) [13], а потом и перерабатывались (2004 г. [8] и 2013 г. [10]). Вместе с тем предпринимаемые меры приводили не к повышению процента найденных наследственных мутаций, а к его снижению. Некоторые ученые связывали это с недостаточной чувствительностью методов. Так, был проведен поиск наследственных мутаций в генах MMR с помощью нескольких различных способов, при этом частота найденных мутаций увеличилась до 92% среди семей, удовлетворяющих Амстердамским критериям, и до 70% среди «амстердам-негативных» семей [14].

Несмотря на столь серьезные усилия в разработке критериев и клинических рекомендаций, около 25% носителей мутаций в генах MMR им не соответствуют, а значит, могут быть пропущены [15]. В связи с тем, что до настоящего момента нет клинических критериев, для которых выявление наследственных мутаций у пораженных пробандов было бы близко к 100%, часть авторов предлагают свои критерии отбора и методы поиска, которые впоследствии подтверждают или опровергают в проводимых исследованиях.

Говоря о колоректальных синдромах, нельзя не упомянуть «семейный колоректальный раковый синдром X типа», для которого характерна семейная отягощенность заболевания, а главным диагностическим признаком служит микросателлитная стабильность в опухоли [7].

Важность дифференцировки наследственных и спорадических форм колоректального рака обусловлена возможностью диагностики заболевания на ранней стадии у носителей наследственных мутаций, а также различиями в подходах к лечению.

В отделе лабораторной генетики ФГБУ ГНЦ колопроктологии Минздрава России предпринято систематическое исследование микросателлитной нестабильности и генов *MLH1*, *MSH2* и *MSH6* среди больных с разными формами неполипозного колоректального рака толстой кишки. Результатам проведенного исследования посвящена данная статья.

Материал и методы исследования

Были обследованы 73 больных гистологически подтвержденным раком толстой кишки, проходивших лечение в ГНЦ колопроктологии в период с 1 октября 2012 г. по 31 августа 2013 г. Критерием исключения из исследования служил семейный аденоматоз толстой кишки. Все пациенты были разделены на две группы (табл. 1). В первую группу вошли 50 больных со спорадической формой заболевания, у них в семье не было родственников, пораженных РТК. Во вторую группу включены 23 человека, в чьих семьях был еще один или более родственников с диагнозом РТК.

ДНК из лимфоцитов периферической крови, биопсийного материала и блоков выделяли с использованием набора «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА» фирмы «ДНК-технология».

Исследование микросателлитной нестабильности проводили фрагментным анализом на приборе «ABI PRISM 3500» (8 capillaries; Applied Biosystems) с помощью пяти мононуклеотидных маркеров — NR21, NR24, NR27, BAT25 и BAT26.

У пациентов, в чьих опухолевых образцах выявили микросателлитную нестабильность, методом полимеразной цепной реакции с использованием 53 пар праймеров амплифицировали все 45 кодирующих экзонов генов *MLH1*, *MSH2* и *MSH6* с примыкающими частями интронов (50–100 пар нуклеотидов).

Варианты первичной структуры амплифицированных фрагментов ДНК выявляли с помощью конформационно-чувствительного электрофореза. Электрофорез проводили в 10% полиакриламидном геле. Фрагменты ДНК с электрофоретически обнаруженными вариантами секвенировали по двум комплементарным цепям с помощью прибора «ABI PRISM 3500» (8 capillaries; Applied Biosystems).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistica 10.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Первым этапом работы было проведение исследования микросателлитной нестабильности в образцах опухоли всех 73 пациентов. В случае обнаружения опухолевой МСН вторым этапом у данного пациента проводился поиск наследственной мутации в генах MMR.

Таблица 1

Характеристика пациентов

Показатель	Спорадический КРР, n=50	Наследственный КРР, n=23
Средний возраст, лет	55 (25–81)	51 (33–69)
Мужчины/женщины	22/28	12/11
Локализация опухоли:		
прямая кишка	20	6
ободочная кишка	30	17
Метахронные опухоли	5	5
Стадия рака:		
I (T1–2N0M0)	2	4
II (T3–4N0M0)	31	12
III (T любая N1–2M0)	12	4
IV (T любая N любая M1)	5	3
Дифференцировка опухоли:		
высокодифференцированные	0	0
умереннодифференцированные	39	20
низкодифференцированные	1	0
слизистые	10	3

Примечание. Для метакронных раков данные указаны по первой опухоли

Таблица 2

Результаты обследования пациентов со спорадической формой РТК

Показатель	Больные в возрасте		p
	42 лет и моложе, n=12	старше 42 лет, n=38	
МСН в опухоли	5/12 (41,7%)	5/38 (13,2%)	0,046
Мутации в генах MMR	3/12 (25%)	0/38 (0%)	0,01

Таблица 3

Данные о первой подгруппе пациентов (n=11) с семейным колоректальным раком

Пациент	Возраст возникновения РТК		МСН
	у обследованных пациентов	у родственника	
1	45	65	Не выявлена
2	72	61	»
3	49	56	»
4	66	70	»
5	63	62	»
6	62	56	»
7	58	62	»
8	62	50	»
9	60	61	»
10	60	58	»
11	54	60	»

При исследовании выборки больных со спорадической формой РТК в 10 из 50 образцов опухоли была обнаружена микросателлитная нестабильность. По частоте ее встречаемости данная выборка разделилась на две подгруппы. У пациентов моложе 42 лет опухолевая МСН выявлялась в 3 раза чаще, чем у пациентов старше 42 лет ($p=0,046$) – табл. 2. Это обстоятельство крайне важно, так как РТК у носителей мутации в генах *MLH1* и *MSH2* возникают именно в возрасте около 42 лет [6].

Наследственные мутации в генах MMR выявлены только у лиц возрастной группы до 42 лет, что также является статистически достоверным фактом ($p=0,01$).

У 3 пациентов обнаружены наследственные мутации p.Lys618del и p.Cys680Arg в гене *MLH1* и p.I745N в гене *MSH6*. Мутации в гене *MLH1* были описаны ранее.

Миссенс-мутация p.I745N в гене *MSH6* не встретилась в международной базе данных InSiGHT (www.insight-group.org) и описывается нами впервые. Наличие микросателлитной нестабильности и сам факт того, что данный вариант еще не был найден, указывают скорее на его патогенный характер.

Таким образом, частота наследственных мутаций в генах MMR у пациентов с РТК, возникшим в возрасте до 42 лет, составила 25% (3/12).

При исследовании выборки больных, имевших одного или более родственников, страдавших

РТК, микросателлитная нестабильность в опухолевых клетках была выявлена в 7 случаях из 23. Необходимо отметить, что у всех этих 7 пациентов в семье было минимум два родственника с РТК.

По частоте выявленной опухолевой МСН группа пациентов с наличием семейного анамнеза делится на две подгруппы:

- 1) семьи с двумя пораженными родственниками ($n=11$);
- 2) семьи с тремя и более пораженными родственниками ($n=12$).

Частота опухолевой МСН в первой подгруппе составила 0% (0/11) – табл. 3, во второй – 58,3% (7/12) – табл. 4. Это различие статистически достоверно ($p=0,0046$). Средний возраст возникновения заболевания у пациентов с одним пораженным родственником составил $59,2 \pm 7,6$ года, а пробандов с двумя и более пораженными родственниками – $44,3 \pm 7,6$ года (рис. 1). Данное различие также статистически достоверно ($t=4,69$; $df=21$; $p=0,0001$).

Результаты, полученные у пациентов первой подгруппы, входят в перечень особенностей, характерных для «Семейного колоректального рака X типа» [7]:

- риск развития колоректального рака умеренно высокий;
- развитие заболевания в 50–60 лет;
- риск развития рака другой локализации не известен;

Таблица 4

Данные о второй подгруппе пациентов (n=12), с семейным колоректальным раком

Пациент	Возраст возникновения РТК	Случаи РТК в семье	МСН	Мутация в генах MMR
1	39	2	Не выявлена	—
2	40	3	»	—
3	39	2	»	—
4	56	2	»	—
5	47	4	»	—
6	55	6	Выявлена	p.R100X — MLH1
7	42	2	»	c.546–2A>G — MLH1
8	40	2	»	c.1896+1G>C — MLH1
9	33	3	»	p.R100P — MLH1
10	56	2	»	—
11	42	2	»	c.942+3A>T — MSH2
12	43	2	»	p.691delAT — MLH1

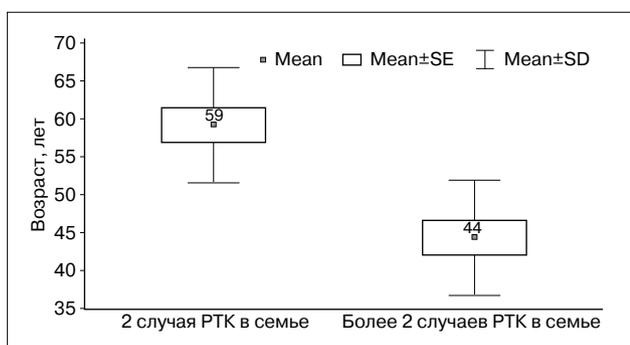


Рис. 1. Средний возраст возникновения РТК у пробында в зависимости от количества пораженных родственников

- опухоли микросателлитно стабильны;
- наследственных мутаций в генах MMR не описано.

Обследованные пациенты соответствуют большинству указанных особенностей семейного колоректального рака X типа, а именно: возраст развития заболевания, наличие микросателлит-

но-стабильной опухоли и как следствие отсутствие наследственной мутации в генах MMR (см. табл. 3). Таким образом, больных первой подгруппы с высокой долей вероятности нужно отнести к семейному колоректальному раку X типа.

У 7 пациентов второй подгруппы, в чьих опухолевых образцах была обнаружена МСН, проводился поиск наследственных мутаций в генах MMR (см. табл. 4). Герминальные мутации найдены у 6 пробандов.

В гене *MLH1* выявлено 5 мутаций: p.R100X, c.546–2A>G, c.1896+1G>C, p.691delAT, p.R100P; в гене *MSH2* — c.942+3A>T. Мутации p.R100X, p.R100P, c.546–2A>G и c.942+3A>T были описаны ранее. Мутация c.1896+1G>C в гене *MLH1* описывается нами впервые, хотя в этом же участке гена уже обнаруживались две патогенные мутации — c.1896+1G>A и c.1896+1G>T. Наконец, мутация p.691delAT (рис. 2) тоже описывается нами впервые. Те факты, что она приводит к возникновению укороченного белка, а также обнаруженная МСН в опухоли указывают на патогенность данной мутации.

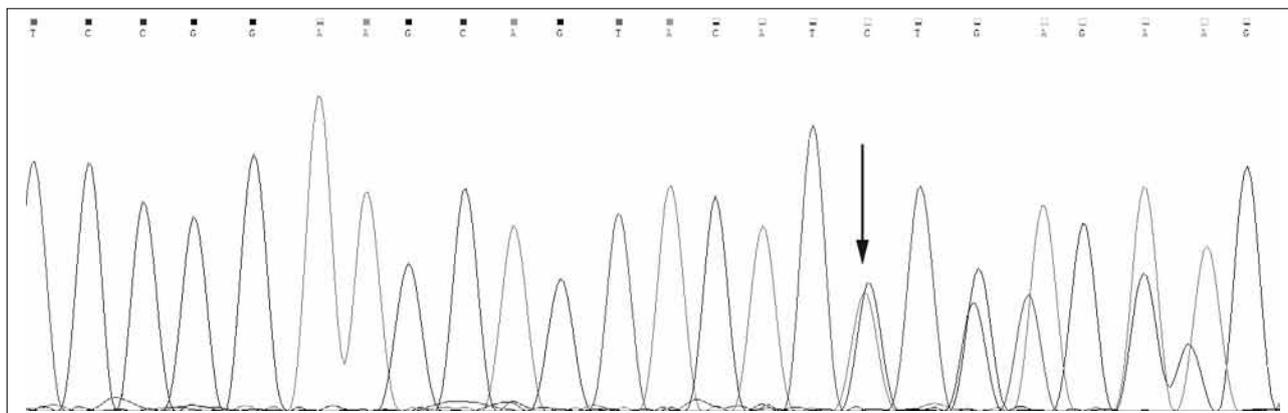


Рис. 2. Сиквенс кодирующего экзона гена *MLH1* у пациента с мутацией p.691delAT (указана стрелкой)

Средний возраст пациентов с мутациями в генах MMR составил 42,5 года, что также говорит в пользу правильности выбора данного возраста у больных со спорадической формой РТК.

Таким образом, частота наследственных мутаций в генах MMR у пациентов с РТК, в чьих семьях было еще два пораженных родственника, составила 50% (6/12).

Итак, в результате исследования молодых российских пациентов (до 42 лет) со спорадической формой РТК частота наследственных мутаций в генах MMR составила 25% (3/12). Кроме того, средний возраст пробандов с мутацией и наличиемотягощенного семейного анамнеза равнялся 42,5 года. Полученные данные указывают на возможность введения нового **первого критерия** поиска больных с синдромом Линча: РТК у пациента в возрасте до 42 лет и наличие в опухоли микросателлитной нестабильности.

Частота мутаций в генах MMR у пациентов с РТК, в чьих семьях имелось еще два пораженных родственника, составила 50% (6/12). Данные результаты позволяют сформулировать **второй критерий** поиска синдрома Линча: пациент с выявленной МСН в опухоли толстой кишки, в семье которого имеются еще два пораженных родственника.

Как говорилось ранее, для дифференциальной диагностики синдрома Линча уже вводились специальные критерии. Так, описанные Амстердамские критерии от 1991 г. [11] были расширены в 1999 г. [13] дополнительным пунктом о наличии в семье родственников с опухолью внекишечной локализации. Однако в 2004 г. были введены переработанные критерии, получившие название «критерии Bethesda» [8]:

– колоректальный рак, возникший в возрасте до 50 лет;

– наличие синхронных, метахронных опухолей толстой кишки или опухоли, ассоциированной с синдромом Линча, независимо от возраста;

– колоректальный рак с повышенным уровнем микросателлитной нестабильности, диагностированный в возрасте до 60 лет;

– рак толстой кишки, выявленный у двух или более родственников первой или второй степени родства в любом возрасте;

– колоректальный рак, диагностированный у одного или более родственников первой степени родства в сочетании с опухолью, ассоциированной с синдромом Линча, при возникновении одного рака в возрасте до 50 лет.

После введения этих критериев количество выявленных пациентов с синдромом Линча увеличилось, однако эффективность критериев сни-

зилась, составив от 10 до 20% (этот показатель для более жестких Амстердамских критериев составлял от 40 до 60%) [9]. Данный факт легко объяснить, так как введение расширенных границ поиска подразумевает исследование существенно большего числа пациентов, а следовательно, большего числа и негативных результатов, поскольку мы знаем, что частота рассматриваемого синдрома не превышает 3% [12] от общего количества больных РТК.

Рассмотрим основные существующие критерии (Амстердамские и Bethesda) применительно к полученным нами данным.

Из 9 пациентов с синдромом Линча под Амстердамские критерии попадают только 6. Это говорит о том, что если бы мы опирались только на них, то потеряли бы треть найденных. С другой стороны, все 9 пациентов соответствуют критериям Bethesda. Однако если рассмотреть анализируемых нами лиц с точки зрения этих критериев, то у всех пациентов, которых мы отнесли к X типу, следовало бы исследовать гены MMR, что привело бы к существенному (почти в 2 раза) снижению эффективности поиска.

Таким образом, в случае использования нами этих распространенных критериев эффективность поиска больных с синдромом Линча была бы снижена в любом случае либо из-за недообследования молодых пациентов со спорадической формой РТК, либо из-за напрасного обследования больных с семейным колоректальным раком X типа. Соответственно введение новых критериев поиска именно российских пациентов с синдромом Линча вполне обосновано.

Выводы

При молекулярно-генетическом исследовании, проведенном у 73 пациентов с РТК, у 9 обнаружены наследственные мутации в генах MMR, что позволило диагностировать у них синдром Линча. Три наследственные мутации описаны впервые в мире.

Рекомендованы *два критерия для дифференциации синдрома Линча* с синдромом «Семейного колоректального рака X типа», а также с большей частью спорадических случаев РТК: *первый* – РТК у пациента в возрасте до 42 лет и наличие в опухоли микросателлитной нестабильности; *второй* – пациент с выявленной МСН в опухоли толстой кишки, в семье которого встретились еще два пораженных родственника. Эффективность первого критерия составила 60% (3/5), второго – 85,7% (6/7).

Список литературы

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2009 г. // Вестн. РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. — 2011. — Т. 22, № 3 (85). — Прил. 1.
1. Davydov M.I., Aksel E.M. Statistics of malignant neoplasms in Russia and the countries CIS in 2009 // Vestn. Blokhin ROSC RAMS. — 2011. — Vol. 22, № 3 (85). — Suppl. 1.
2. Цуканов А.С., Поспехова Н.И., Любченко Л.Н. и др. Молекулярно-генетический анализ генов наследственной предрасположенности к раку желудка // Мед. генетика. — 2007. — № 12. — С. 30–34.
2. Tsukanov A.S., Pospekhova N.I., Lyubchenko L.N. et al. Molecular genetic analysis of genes of stomach cancer hereditary predisposition // Med. genetika. — 2007. — № 12. — P. 30–34.
3. Geiersbach K.B., Samowitz W.S. Microsatellite instability and colorectal cancer // Arch. Pathol. Lab. Med. — 2011. — N 135 (10). — P.1269–77.
4. Lynch H.T., Lynch P.M., Lanspa S.J. et al. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications // Clin. Genet. — 2009. — N 76. — P. 1–18.
5. Peltomaki P. Lynch syndrome genes // Familial Cancer. — 2005. — N 4. — P. 227–32.
6. Pérez-Cabornero L., Infante M., Velasco E. et al. Genotype–phenotype correlation in MMR mutation-positive families with Lynch syndrome // Int. J. Colorectal Dis. — 2013. — N 28 (9). — P. 1195–201.
7. Potter J., Lindor N. Genetics of colorectal cancer // Springer. — 2008. — P. 185.
8. Umar A., Boland C.R., Terdiman J.P. et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability // J. Natl. Cancer Inst. — 2004. — Vol. 96. — P. 261–8.
9. Vasen H., Möslein G., Alonso A. et al. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer) // J. Med. Genet. — 2007. — N 44. — P. 353–62.
10. Vasen H.F., Blanco I., Aktan-Collan K. et al. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts // Gut. — 2013. — N 62. — P. 812–23.
11. Vasen H.F., Mecklin J.P., Khan P.M. et al. International Collaborative Group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC) // Dis. Colon Rectum. — 1991. — Vol. 34. — P. 424–5.
12. Vasen H.F., Moslein G., Alonso A. et al. Recommendations to improve identification of hereditary and familial colorectal cancer in Europe // Fam. Cancer. — 2010. — N 9. — P. 109–15.
13. Vasen H.F., Watsan P., Mecklin J.P. et al. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC // Gastroenterology. — 1999. — Vol. 116. — P. 1453–6.
14. Wagner A., Barrows A., Wijnen J.T. et al. Molecular analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the United States: High mutation detection rate among clinically selected families and characterization of an American founder genomic deletion of the MSH2 gene // Am. J. Hum. Genet. — 2003. — N 72. — P. 1088–100.
15. Weissman S.M., Burt R., Church J. et al. Identification of individuals at risk for Lynch syndrome using targeted evaluations and genetic testing: National society of genetic counselors and the collaborative group of the Americas on inherited colorectal cancer joint practice guideline // J. Genet. Couns. — 2012. — N 21 (4). — P. 484–93.