

ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАЦИЙ В ОНКОГЕНЕ hMLH1 ПРИ РАКЕ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА

О.Е. Кузнецов¹, О.В. Горчакова²

¹Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Беларусь,
olegkuznetsov@inbox.ru

²Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь, daniil_go@inbox.ru

Аннотация. Распространенность онкологических заболеваний, их медицинская, социальная и экономическая значимость, делают изучение ранней диагностики и профилактики ключевыми. Опухоль толстого кишечника является распространенным злокачественным новообразованием. Разработан метод молекулярно-биологической диагностики для оценки риска развития опухоли.

Ключевые слова: опухоль, мутации, наследственный рак, полимеразная цепная реакция, молекулярно-биологические исследования

Введение. Распространенность онкологических заболеваний, их медицинская, социальная и экономическая значимость, делают проблему изучения ранней диагностики и профилактики одной из ключевых в современный период [1]. Ежегодно в мире выявляется около 12 млн. новых случаев злокачественных опухолей и 7 млн. пациентов погибают от данной патологии [2]. В Беларуси в год выявляется около 30-40 тыс. больных с впервые в жизни установленным диагнозом злокачественного новообразования [3]. **Опухоли кишечника** – достаточно распространенное злокачественное новообразование. Высокий риск его развития сопряжен, в том числе и с наследственными синдромами, к которым следует отнести редкие наследуемые «онкологические синдромы»: семьи, в которых разными формами опухолей страдают родственники.

Интерес к определению молекулярно-биологических маркеров в онкологии требует разработки методов оценки изменений, происходящих в опухолевых клетках. Методы определения основаны на определении изменений на уровне генома или белка. Стандарты для определения молекулярно-биологических маркеров интенсивно изучаются в настоящее время и новые научно-практические исследования в данном направлении актуальны.

Цель исследования – оценить разработанную, на основе предложенных праймеров, методику выявления мутаций в онкогене hMLH1.

Материал и методы исследования. Работа основана на ретроспективном анализе данных 382 пациентов с раком толстого кишечника (РТК), подвергшихся лечению в онкологическом диспансере Гродненского региона (2006-2019). Возраст пациентов: 60,07±11,5 лет. Пациенты возрастной группы старше 50 лет составили 88,4%. Количество мужчин – 37%, женщин – 63%. Все пациенты были подвергнуты хирургическому лечению. Распределение пациентов в зависимости от гистологического строения опухолей производилось в соответствии с Международной гистологической классификацией опухолей кишечника [Morson В.С., 1981]: высокодифференцированная аденокарцинома – 15%, умеренно-дифференцированная – 55%, низкодифференцированная аденокарцинома – 25%, недифференцированный рак – 5%. Стадия опухолевого процесса было определена согласно Международной классификации злокачественных опухолей по системе TNM: I (T1-2N0M0) – 12%, II (T3-4N0M0) – 32%, III (любая TN1-2M0) – 26%, IV (любая T, любая N, M1) – 30%.

Для формирования группы пациентов, нуждающейся в проведении молекулярно-генетической диагностики РТК, использована информация, содержащаяся в медицинских картах. Для проведения генетической диагностики, с целью выявления наследственно детерминированных процессов, отбирались лица на основании наличия у них основных клинических факторов риска развития наследственного синдрома (Амстердамские критерии, критерии Бетезды) [Vasen H.F. et al., 1999; Umar A. Et al., 2004; Приказ МЗ РБ №1018 от 27.12.2007 «Об онкогенетическом консультировании»].

Для исследования отобрано 19 образцов тканей пациентов с РТК (колоректальный рак) из архива Гродненского областного клинического патологоанатомического бюро, состоящих на учете в областном онкологическом регистре, с морфологически верифицированной опухолью (морфологически подтверждено злокачественное новообразование толстого кишечника, как основной клинический диагноз, три и более критерия): углубленная генетическая диагностика для выявления

наследственно детерминированных процессов (молекулярно-генетическое исследование образцов ДНК на наличие мутаций в гене *MLH1* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и методом прямого секвенирования).

Материал для исследования – опухолевая ткань (парафиновые блоки), из которых 9 (47,4%) образцов принадлежали лицам мужского пола. Выделение ДНК из ткани проводилось посредством стандартного протокола (MagneSil Genomic Fixed System, Promega, США). Амплификация выделенной ДНК выполнена по разработанному и заданному протоколу в автоматическом режиме на амплификаторе-термоциклере (ПЦР) и секвенаторе (набор для секвенирования, секвенатор «Genetic Analyzer», Applied Biosystems, США, согласно инструкции производителя), ПЦР – праймерами (подобранные с использованием международной базы данных последовательности праймеров гена *hMLH1*, BLAST Assembled Genomes (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#>): 1-19 экзон гена *hMLH1*. Синтез праймеров гена *hMLH1* по последовательности нуклеотидов – Праймтех, Беларусь.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием стандартного пакета прикладных статистических программ Statistica и методов доказательной медицины.

Результаты исследований. Этапом диагностики являлся лабораторный тест углубленной генетической диагностики на наличие герминогенных мутаций: исследован ген из группы генов репарации ДНК – *hMLH1* (70% герминогенных мутаций приходится на долю генов *MLH1*) [Munoz J.C. et al., 2009]. Для молекулярно-генетического исследования образцов ДНК на наличие мутаций в гене *MLH1* (ПЦР, секвенирование) из ткани в парафине готовили серийные срезы в соответствии с утвержденными протоколами. ДНК выделялась по протоколу. Контроль количественных и качественных характеристик ДНК выполнен спектрофотометрически (спектрофотометр Eppendorf BioPhotometer Plus, Германия). Для корректности результата образцы тестированы в дублях.

При разработке методики, изначально экспериментальным путем подобрали количество реагентов, составляющих ПЦР-смесь (master-mix): объем биологического субстрата с выделенной ДНК и $MgCl_2$. Оптимальный объем стартовой ДНК равен 3 мкл. Для обнаружения мутаций гена *MLH1* на приготовленном master-mix и стартовом количестве ДНК установлены температурные режимы плавления и количество повторяемости циклов амплификации. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации стандартное: на агарозном геле – 12,5 мкл продукта, 120В - 40 мин. Дополнительный контроль характеристик ДНК выполнен на спектрофотометр Eppendorf BioPhotometer Plus, Германия.

В ходе проведения реакции выделения ДНК из блоков ткани получено из отобранных образцов 19 образцов ДНК, с молекулярным весом достаточным для проведения реакций по определению мутаций в гене *MLH1*. Результаты постановки реакции ПЦР в режиме электрофоретической детекции образцов тканей опухолевой природы пациентов представлены на рисунке.

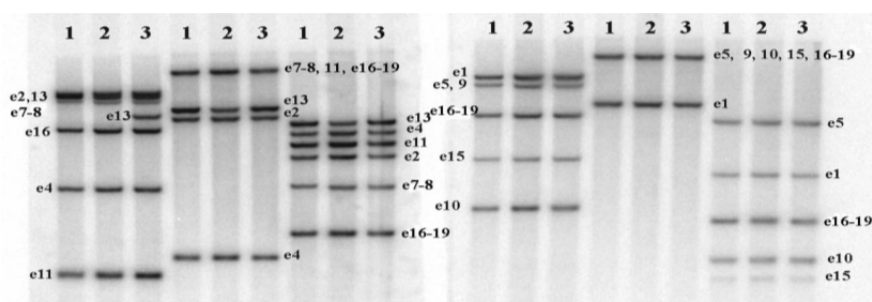


Рисунок – *hMLH1*. Анализ образцов ткани (гель-электрофорез)

Установлено, что предложенная методика ПЦР позволила выявить и проанализировать исследуемые экзоны гена *hMLH1*.

На основании критериев наследственных опухолей и исследования образцов ткани опухолевой природы образцов лиц, в семейном анамнезе которых есть как пациенты с раком (образец №01: женщина, русская, 53 года, С.20. - рак верхнеампулярного отдела прямой кишки, ст. II Т3N2M1/ метастазы в печени IV ст., у матери – рак прямой кишки, у тети – рак прямой кишки, у бабушки рак ректосигмоидного соединения) так и пациенты, в анамнезе родственников которых не отмече-

но наличие опухолей (по данным истории жизни): выявлена мутация с.1975 C>T (экзон 17) и замена оснований G>A 8 экзона G655A гена hMLH1.

Результат секвенирования гена выявили замены оснований G>A и C>T в областях экзон 8-го и 17-го: детектированы мутации с.1975 C>T (167 п.о., 17 экзон) – мутация ассоциирована с синдромом Линча, спорадическим колоректальный рак, язвенный колит, лимфобластная лейкемия, рак легкого, рак простат [10].

Параллельного тестирования положительного стандарта ДНК, в которой ген hMLH1 содержит мутацию не было по причине отсутствия такого образца. Образец являлся отрицательным, т.е. без мутации, если детектируемый фрагмент образца не равен или не соответствовал искомому молекулярному весу (п.о.) при отсутствии данной мутации при секвенировании.

Заключение. Разработана и предложена специфичная и эффективная методика определения мутации в онкогене hMLH1 методом ПЦР с использованием подобранной последовательности нуклеотидов праймеров отечественного производства: параллельный сиквенс-анализ Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США), совпадение результатов в 100%.

Проведенный анализ материала определил наличие мутаций в «критических» экзонах гена hMLH1: обнаружена мутация экзона 17 гена MLH1, впервые описанная в 1996 году (имеет клиническое значение, описаны случаи в популяциях Финляндии, Великобритании, США и Индии) и выявлена замена оснований G>A 8 экзона. Обнаруженные нами нуклеотидные замены клинически практически не изучены, мало изучены в функциональном смысле и, возможно, относятся к вариантам полиморфизма. Обнаруженная нуклеотидная замена G>A (8 экзон, hMLH1) не представлена в литературных данных доступных баз данных, мало изучена в функциональном смысле и, возможно, относится к вариантам полиморфизма. Анализ других значимых районов указанных генов будет продолжен.

Сравнительная оценка методов позволяет говорить о диагностической чувствительности предложенного к исследованию метода на основе последовательностей праймеров отечественного производства по предлагаемой методике. Себестоимость одного исследования мутации hMLH1 (19 экзонов) при использовании реагентов отечественного производства составила 37,1 у.е. против 119,3 у.е. в пользу отечественного производителя.

Полученные данные позволяют говорить о необходимости внедрения в практическую работу молекулярно-биологических методов исследования на наличие мутаций в гене hMLH1, как одного из направлений диагностики и профилактики в современный период.

Список использованных источников

1. Bray F. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray [et al.] // CA Cancer J Clin. – 2018. – Vol. 68, №6. – P. 394–424.
2. Океанов, А.Е. [и др.]. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь (2008-2017) / А.Е. Океанов, П.И. Моисеев, Л.Ф. Левин // под редакцией О. Г. Суконко; Министерство здравоохранения Беларуси, Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова. – Минск, 2018. – 373с.
3. Кузнецов О.Е. Наследственный колоректальный рак: hMLH1 и hMSH2 / О.Е. Кузнецов, О.В. Горчакова, Д.Ю. Болотов // Актуальные научные исследования в современном мире. Сб. научных трудов. – Переяслав-Хмельницкий, 2018. – Вып. 3(35), ч. 7 – 149 с. – с.93-95.