

# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ НОВООБРАЗОВАНИЯХ КИШЕЧНИКА

Горчакова О.В., Кузнецов О.Е.

*Гродненский государственный медицинский университет*

**Актуальность.** Новообразования кишечника являются значимой проблемой медицины. Несмотря на постоянное совершенствование методов диагностики и лечения, заболеваемость и смертность продолжают расти. По данным IDCA (International Digestive Cancer Alliance) ежегодно в мире регистрируется около 950 000 новых случаев рака толстой кишки [1, 2, 4].

Беларусь входит в группу стран с относительно не высокими уровнями заболеваемости, мало отличающимися от стран Балтии, России и Украины: заболеваемость населения 484,3 на 100 тыс. населения в 2015 году в сравнении с 328,7 в 2000 году. [3]. Ежегодно в стране регистрируется около 2 557 новых случаев опухолей кишечника и 1 938 случаев рака прямой кишки [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**, 3]. В Гродненской области в 2014 году на учете состояло 1805 пациентов с колоректальным раком (КРР), из них на долю женщин приходилось 57,8% (1043 случая). Ежегодно регистрируется около 440 новых случаев. Одногодичная летальность составляет 24,8% – 31,2%.

Одним из главных факторов риска развития КРР является возраст: риск возникновения повышается у лиц старше 55. В последнее время чаще опухоли кишечника начали выявляться у пациентов в возрасте до 50 лет, что наводит на мысль о наследственном характере данного заболевания. На долю наследственных процессов приходится от 5-15% всех новообразований толстой кишки [3]. В основе развития лежит наличие герминогенных мутаций в ДНК [2]. К настоящему времени идентифицировано 7 основных генов, ассоциированных с развитием синдрома Линча: hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS1, hPMS2, hMSH3 и EHO1. Основная доля мутаций (до 90%) приходится на гены hMLH1 и hMSH2 [3, 5].

Сегодня в Беларуси практически не выполняются генетические исследования по определению онкогенов hMLH1 и hMSH2 «доступной» технологией. Существующие методы определения мутаций онкогенов носят «закрытый» характер, т.е. исследование

возможно к выполнению только на специализированном генетическом оборудовании, например или методом прямого секвенирования. Данное оборудование в стране представлено в единичных экземплярах, исследования выполняются в рамках научно-исследовательских проектов.

На основании вышеизложенного, представляется целесообразным разработать и внедрить в клиническую практику комплексного подхода к диагностике и профилактике наследственных опухолей толстого кишечника, в том числе генетически ассоциированных и не ассоциированных с ним формами, с использованием молекулярно-биологического и клинико-генеалогического метода, как основных, направленных на выявление пациентов с высоким риском развития новообразований.

**Цель.** Разработать и апробировать методику выявления мутаций в онкогенах hMLH1 и hMSH2 на основе предложенных праймеров.

**Методы исследования.** Исследование выполнено на кафедре клинической лабораторной диагностики и иммунологии ГрГМУ (2014-2017 гг.): ретроспективный анализ данных 865 пациентов с опухолями кишечника (подвергшихся лечению, период 1999-2016 г.). Возраст пациентов:  $60,07 \pm 11,5$  лет (31–77 лет), старше 50 лет – 88,4%, мужчин – 247 (37%). Распределение пациентов в зависимости от гистологического строения опухолей – Международная гистологическая классификация опухолей кишечника [Morson В.С., 1981].

Формирование группы исследования: на основании наличия 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»].

Критериям для проведения молекулярно-генетического исследования соответствовало 16 случаев (19 образцов с установленным и морфологически верифицированным диагнозом колоректальный рак из архива Гродненского патологоанатомического бюро (материал – парафиновые блоки с образцами опухолевой ткани).

Этапом диагностики являлся тест углубленной диагностики на наличие герминогенных мутаций в генах hMLH1 и hMSH2. Статистическая обработка результата: пакет программ Statistica.

**Результаты и их обсуждения.** Выявление мутаций в кодирующих последовательностях генов hMLH1 и hMSH2 проводилось при помощи метода полимеразной цепной реакции

(ПЦР): электрофоретическая детекция с использованием подобранной последовательности нуклеотидов (праймеров) и реагентов отечественного производителя («Праймтех», Беларусь). Амплификация выделенной ДНК выполнена в автоматическом режиме на амплификаторе-термоциклере.

Проведено исследование образцов ткани опухолевой природы пациентов на предмет наличия мутации гена hMLH1/hMSH2, образец № 11 и 8 (в семейном анамнезе пациентов есть больные колоректальным раком).

Результаты молекулярно-генетического исследования (полимеразная цепная реакция) пациента № 11 и № 8 представлены в таблице.

Таблица. Результат молекулярно-генетического исследования (полимеразная цепная реакция, секвенирование)

Пациент	Мутации		
	ген	экзон	мутация
№ 11/8	hMLH1	17 экзон	обнаружена
		8 экзон	обнаружена
	hMSH2	8 экзон	обнаружена
		11 экзон	обнаружена

Таким образом, проведенный молекулярно-генетический анализ методом полимеразной цепной реакции (предложенной методикой) определил наличие мутаций в гене hMLH1 и hMSH2 по «критическому» району гена: обнаружены мутация экзона 8, 11 и 17 генов. Обнаруженные нами нуклеотидные замены клинически мало изучены, за исключением hMLH1 экзон 17 (описанная в 1996 году в популяциях Финляндии, Великобритании, США и Индии). Анализ значимых районов указанных генов будет продолжен.

**Выводы.** Впервые проведено молекулярно-биологическое исследование выделенной ДНК, выделенной из образцов опухолевой ткани, на предмет наличия мутаций в двух генах одновременно (hMLH1 и hMSH2).

В 2-х случаях в гене hMLH1 (исследуемый экзон 8, 17) и 2-х случаях гена hMSH2 детектированы мутации в 8, 11 и 17 экзонах. Мутация hMLH1 – экзон 17 (с.1975 C>T, 167 п.о.) ассоциирована с синдромом Линча, спорадическим КРР, язвенным колитом, лимфобластной лейкемией, раком легкого, раком простаты

[Renkonen E., Zhang Y., Lohi H., Salovaara R., Abdel-Rahman W.M. et al. / Altered Expression of MLH1, MSH2 and MSH6 in predisposition to Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer // J/ Clin/ Oncol/ - 2003/ - Vol/ 21, № 19. - P.3629-3637], 8 экзон G655A (142-150 п.о.).

Предложенная методика определения мутации методом полимеразной цепной реакции с электрофоретической схемой детекции с использованием подобранной последовательности праймеров позволила выявить герминогенные мутации: ген hMLH1 - мутация в экзоне 8, мутация экзон 17; ген hMSH2 мутация экзон 8 и экзон 11. Полученные данные позволяют говорить о необходимости внедрения в практическую работу клиничко-диагностических лабораторий молекулярно-биологических методов исследования на наличие мутаций в генах hMLH1 и hMSH2, как одного из направлений диагностики и профилактики в современный период. С целью клинической оценки обнаруженных мутаций в белорусской популяции исследования продолжены.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Диагностика рака молочной железы / Под ред. проф. В.А. Хайленко. Д.В. Комова, В.Н. Богатырева // Медицинское информационное агентство. – Москва. – 2005. – 240с.
2. Злокачественные новообразования в Беларуси / под ред. М.М. Сачек, А.И. Ларионова. // РНПЦ МТ. – Минск. – 2010. – 205 с.
3. Злокачественные новообразования в Беларуси 1995-2004 / Под ред. А.А. Граковича, И.В. Залуцкого // БЕЛЦМТ. – Минск. – 2005. – 180 с.
4. Океанов, А.Е. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь (2002 – 2011) / А.Е. Океанов, П.И. Моисеев, Л.Ф. Левин. Под ред. О.Г. Сукошко. // РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова. – Минск. – 2012. – 333 с.
5. Knudson A.G. Hereditary cancers: from discovery to intervention / J. Natl. Cancer Inst Monogr 1995; 17:5-7.

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПОЧКАХ КРЫС ПРИ ПАРЕНТЕРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ЦИТРАТА ТИТАНА

Горшкова Д.А., Лях И.В., Пекошевский В., Курбат М.Н.

*Гродненский государственный медицинский университет*

**Актуальность.** Постоянный и неизбежный процесс старения приводит к повышению спроса на восстановление функций поврежденных органов [4]. Сплавы титана на сегодняшний день являются основным биоматериалом для изготовления имплантатов,