

А.С. Цуканов¹, Ю.А. Шелыгин¹, В.Н. Кашиников¹, С.А. Фролов¹, Л.Н. Любченко²,
В.П. Шубин¹, А.В. Карпухин³, Т.А. Музаффарова³, Н.И. Поспехова¹

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ДИФфуЗНОМУ РАКУ ЖЕЛУДКА У РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ

¹ ФГБУ Государственный научный центр колопроктологии Минздрава России, Москва,

² ФГБУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

³ ФГБУ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва,

Около 3% случаев рака желудка (РЖ) связаны с наследственной предрасположенностью. Молекулярные причины наследственной предрасположенности к диффузному (перстневидноклеточному) РЖ среди российских больных ранее не были изучены. В настоящей работе проведено молекулярно-генетическое исследование у 9 пробандов с перстневидноклеточным РЖ. Поиск наследственных мутаций проводился в ген-супрессоре диффузного РЖ — гене *CDH1*. Нами обнаружена новая наследственная мутация (с.1005delA) и один редкий вариант (с.2253C>T). Частота наследственных мутаций в выборке российских пациентов составила 1/9 (11,1%).

Ключевые слова: наследственный диффузный рак желудка, мутации, ген-супрессор

Согласно международным данным, в 2012 г. РЖ занимал шестое место по заболеваемости и третье по смертности среди всех онкологических заболеваний [20].

Для суждения о патогенезе рака желудка и разработки мер его профилактики принята классификация Laugen, предложенная им в 1965 г. [17]. Согласно этой классификации РЖ подразделяется на 2 типа: *интестинальный* и *диффузный*. Интестинальный тип РЖ представлен атипичным эпителием с хорошо выраженным железистым рисунком. Возникает он, как правило, на фоне атрофического гастрита, чаще встречается у мужчин пожилого возраста, располагаясь в кардиальном отделе. В окружении опухоли обнаруживают выраженную метаплазию кишечного типа. Семейный анамнез при этом типе РЖ не прослеживается. Диффузный тип представлен перстневидными клетками. Встречается реже интестинального (около 30% от общего числа случаев), не связан с кишечной метаплазией эпителия, отличается инфильтративным характером роста и частым изъяз-

влением опухоли. Частота у мужчин и женщин одинакова, появляется в возрасте от 30 (и даже менее) лет [4]. Для данного типа РЖ может быть характерен семейный анамнез.

При исследовании генетических причин диффузного типа РЖ R.F. Becker и соавт. в впервые обнаружили, что 50% первичных диффузных РЖ имеют соматические мутации в гене *CDH1* [6]. Затем были обнаружены наследственные мутации в гене *CDH1* в семьях с диффузным РЖ у двоих и более родственников [7]. С этого момента ген *CDH1* стали считать геном-супрессором диффузного семейного РЖ.

Данный ген располагается в 16-ой хромосоме 16q22.1 и включает 16 экзонов [15]. Кодированный этим геном белок Е-кадгерин является трансмембранным гликопротеином, играющим фундаментальную роль в поддержании клеточной дифференцировки, полярности и нормальной клеточной архитектуры [10], а также, вовлечен в качестве рецептора в Са-зависимую межклеточную адгезию [14].

В 1999 году Международным Консорциумом по Раку Желудка (IGCLC) были введены Критерии наследственного диффузного рака желудка (НДРЖ) [9]:

Два случая диффузного рака желудка у родственников 1-2 степени родства, при этом у одного из больных рак должен быть диагностирован в возрасте до 50 лет.

Три (или более) случая диффузного рака желудка у родственников 1-2 степени родства, независимо от возраста.

Однако с накоплением новых данных относительно НДРЖ вводились дополнительные критерии семей, с повышенной вероятностью имеющих мутации в гене *CDH1*. Так, в 2005 году А. Brooks-Wilson и коллеги [8], проанализировав имеющуюся к этому времени информацию по характеристикам семей с наследственными мутациями в гене *CDH1*, предложили дополнения,

касающиеся раннего возраста возникновения диффузного РЖ и случаев раков другой локализации в семье.

В 2010 г. Международным консорциумом по РЖ были приняты критерии наследственно диффузного РЖ [12]:

1. Два или более случаев РЖ в семье у родственников первой степени родства, один из которых диффузный и диагностирован в возрасте до 50 лет.

2. Три или более случаев диффузного РЖ в семье у родственников первой-второй степени родства, диагностированных в любом возрасте.

3. Индивидуальный случай диффузного РЖ, диагностированный в возрасте до 40 лет.

4. У одного члена семьи диагностирован диффузный РЖ, а у другого дольковый рак молочной железы, любой из раков должен быть до 50 лет.

К настоящему моменту во всем мире обнаружена всего 121 наследственная мутация в гене *CDH1*. При этом необходимо отметить, что для данного гена не характерны «горячие участки», а значит необходимо исследовать все его экзонные области. Кроме того, при исследовании гена *CDH1*, необходимо учитывать, что в разных популяциях, частота наследственных мутаций варьирует от 0 до 40% [3]. Вопрос о частоте мутаций в гене *CDH1* в выборке российских больных диффузным РЖ до настоящего момента оставался открытым.

Кроме мутаций, в гене *CDH1* при РЖ обнаружены редкие и частые однонуклеотидные полиморфизмы, значение которых полностью не выяснено [21].

В настоящей работе предпринято систематическое исследование вариантов гена-супрессора диффузного рака желудка – *CDH1* среди российских пациентов.

Материал и методика

Исследованная выборка включала 9 больных диффузным РЖ. Отбор больных осуществлялся, исходя из диагноза диффузного РЖ, возникшего в возрасте до 40 лет, или присутствия в семье других родственников с РЖ. Возраст в момент диагноза РЖ у пробанда представлен в табл. 1. В большинстве случаев больные РЖ были включены в выборку непосредственно после установления диагноза.

ДНК из лимфоцитов периферической крови выделяли с использованием набора «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА» фирмы ДНК-технология. Методом полимеразной цепной реакции с использованием 16 пар праймеров амплифицировали все 16 экзонов гена *CDH1* с примыкающими частями интронов (50 – 100 п. н.) [7]. Варианты первичной структуры амплифицированных фрагментов ДНК гена *CDH1* выявляли с помощью конформационно-чувствительного электрофореза. Электрофорез проводили в 10% полиакриламидном геле. Фрагменты ДНК с электрофоретически обнаруженными вариантами первичной структуры секвенировали по

двум комплементарным цепям с помощью прибора ABI PRISM 3500.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием точного критерия Фишера. Для расчетов использовали программу Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Для отбора пациентов с диффузным РЖ использовались критерии наследственного диффузного РЖ, определенные Международным консорциумом по РЖ (IGCLC) [9] с следующими дополнениями [12]. Всего было исследовано 9 семей, отвечающих критериям наследственного диффузного РЖ. Характеристика пробандов и их семей представлена в табл. 1. Критериям 1 и 2 удовлетворяет 77,8% семей (табл. 1). Двое больных (22,2%) не имели родственников с РЖ, однако соответствовали критерию 3 — индивидуальный случай диффузного РЖ, диагностированный в возрасте до 40 лет.

У 9 пробандов выборки нами была изучена первичная структура всех кодирующих экзонов гена *CDH1*. В этом гене было обнаружено 2 гетерозиготных варианта, один из которых является редким полиморфизмом, а второй новой мутацией.

Редкий вариант с.2253C>T, обнаруженный у пробанда Д2 в 14 экзоне гена *CDH1*, не приводит к замене аминокислоты. Согласно исследованиям W.F. Bodmer и соавт. [10], редкие варианты генов можно рассматривать как низкопенетрантные факторы риска возникновения заболевания [11]. По данным Y. Zhang частота обнаруженного нами варианта с.2253C>T в гене *CDH1* была достоверно повышена у пациентов с РЖ, в чьих семьях было 2 и более пораженных родственников [$p<0,05$; OR= 3,19 (1,29–7,91)] в возрасте 50 и более лет [22]. Диффузный РЖ у пациента Д2 диагностирован в возрасте 48 лет, а у обоих его родственников после 50, таким образом, средний возраст возникновения РЖ в семье составил 61 год. Учитывая все описанные факты, нельзя исключить патогенного действия данного варианта у пациента Д2.

Мутация с.1005delA была обнаружена нами впервые. Данная мутация была выявлена у пробанда Д9 в возрасте 28 лет (рис. 1,2).

При гастроскопическом исследовании у этой пациентки был обнаружен диффузный РЖ на ранней стадии. У троих ее родственников также был диагностирован диффузный РЖ в возрасте до 50 лет; таким образом, средний возраст возникновения РЖ в семье составил 36 лет. Мутация с.1005delA была обнаружена и у пораженной тети пациентки, что говорит о ее наследственном характере.

Таблица 1. Данные по исследованным пациентам

Пробанд	Возраст в момент диагноза НДРЖ	Случаи РЖ в семье / возраст	Критерии НДРЖ	Вариант в гене CDH1
Д1	59	РЖ — 46	Критерий 1	-
Д2	48	РЖ — 74, РЖ — 61	Критерий 1	с.2253C>T (14 экзон)
Д3	57	РЖ — 50	Критерий 1	-
Д4	36	РЖ — 40	Критерий 1	-
Д5	36	4 РЖ — 34, 20, 42, 68	Критерий 2	-
Д6	16	-	Критерий 3	-
Д7	16	-	Критерий 3	-
Д8	26	РЖ — 56	Критерий 1	-
Д9	28	3 РЖ — 26, 43, 48	Критерий 2	с.1005delA (7 экзон)

Найденная мутация располагается в участке гена, кодирующем экстрацеллюлярный белковый домен, в котором на данный момент обнаружено более половины всех описанных мутаций. Мутация с.1005delA приводит к сдвигу рамки считывания. Из всех типов патогенных мутаций, обнаруженных к настоящему времени это также наиболее частый вариант [20]. Частота мутаций в выборке российских пациентов с диффузным типом РЖ составила 11,1% (1/9).

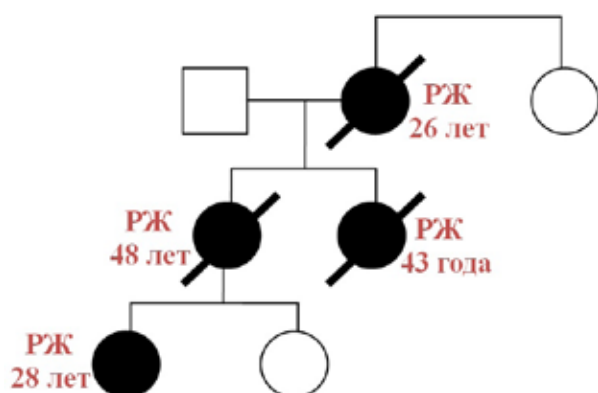


Рис. 1. Родословная семьи с наследованием мутации с.1005delA в гене CDH1

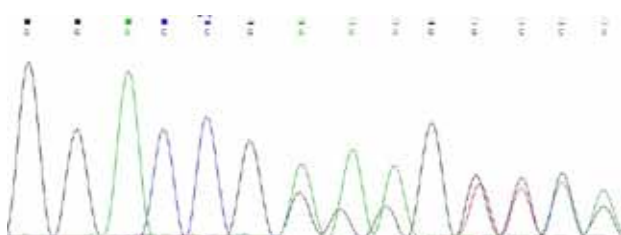


Рис. 2. Сиквенс 7 кодирующего экзона гена CDH1 у пациента Д9. Стрелкой указана мутация с.1005delA

В целом, большинство мутаций в гене *CDH1* (70%) найдено в семьях, соответствующих критериям 1 и 2 [3]. В нашей выборке присутствовало 7 семей,

соответствующих именно этим критериям. У пробандов таких семей в 30% случаев обнаружены мутации в гене *CDH1* [13]. Частота мутаций в гене *CDH1* среди исследованных ранее семей, соответствующих критерию 3, составила около 3 % [5]. Следовательно, вероятность обнаружения мутации у пробандов Д6 и Д7 нашей выборки была невелика.

В ряде работ по изучению выборок РЖ из других популяций, сформированных по критериям наследственного диффузного РЖ, были получены близкие результаты. Так, в популяциях с наибольшей встречаемостью РЖ (Япония, Корея и Китай), частота наследственных мутаций составляла около 10%. Частота мутаций у пациентов из Германии и Италии составила 20-25% [20].

На основании различий частот мутаций в гене *CDH1*, полученных на выборках из разных популяций, некоторые авторы высказывают предположение о наличии обратной корреляции частоты наследственных мутаций в гене *CDH1* с уровнем распространенности РЖ в популяции. Как предполагают, в странах с наиболее высокой заболеваемостью РЖ (Япония, Португалия, Китай) может наблюдаться наименьшая частота мутаций в гене *CDH1*. Наоборот — в странах с наименьшей заболеваемостью РЖ (США, Канада, Англия) имеет место более высокая частота мутаций в этом гене [13]. Однако, данная гипотеза имеет и слабые места в связи с наличием жестких семейных критериев отбора и малым количеством обнаруженных в разных популяциях наследственных мутаций. Наблюдаемая в России частота РЖ (36/100000) [4] может быть оценена как средняя в ряду других стран (например, США — 8/100000, Япония — 69/100000) [18]. Статистическое сравнение наших данных с данными по наиболее репрезентативной выборке, в которой частота мутаций в гене *CDH1* была одной из наибольших (14 обнаруженных мутаций в 42 семьях [8]), не показывает значимого отличия.

В любом случае как в нашем, так и в зарубежных исследованиях наследственные мутации в гене *CDH1* не объясняют все случаи наследственного РЖ, что указывает на необходимость исследования других генов-кандидатов. Одним из таких генов является ген *Trp53*, соматические мутации в котором наблюдаются при многих типах рака, включая рак желудка. Кроме того, наследуемые мутации в этом гене приводят к возникновению синдрома Ли Фраумени (Li Fraumeni), при котором встречается РЖ. При исследовании 34 пробандов с НДРЖ без мутаций в гене *CDH1*, проведенном в Германии, была выявлена одна миссенс-мутация (3%) в гене *Trp53* [16]. На этой же выборке

был осуществлен поиск мутаций в других генах кандидатах – *RUNX3* и *HPP1*. Изменений первичной структуры данных генов не было выявлено. В качестве еще одного гена-кандидата рассматривается ген-супрессор *SMAD4*, наследственные мутации которого приводят к ювенильному полипозу, при котором также наблюдаются случаи РЖ [19].

Кроме того, РЖ может встречаться в семьях с наследственным неполипозным раком толстой кишки (синдром Линча), обусловленным мутациями генов *MLH1* и *MSH2* [2].

Заключение

Проведено молекулярно-генетическое исследование всех экзонных областей гена *CDH1* в российской выборке пациентов с диффузным типом РЖ. В гене *CDH1* обнаружен редкий вариант с.2253C>T, для которого показан повышенный риск развития РЖ.

Мутация с.1005delA в гене *CDH1* обнаружена впервые. Частота мутаций в гене *CDH1* у российских пациентов с наследственным диффузным РЖ составила 11,1% (1/9). Наши результаты не позволяют считать частоту мутаций в гене *CDH1* среди больных наследственным диффузным РЖ в России сниженной по сравнению с соответствующими частотами в других популяциях с близкими показателями заболеваемости.

Результаты работы демонстрируют необходимость исследования мутаций в гене *CDH1* при проведении диагностики наследственной предрасположенности к диффузному типу РЖ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Смертность населения России и стран СНГ от злокачественных новообразований в 2007 г. // Вестник РОНЦ им.Н.Н. Блохина РАМН. – Приложение 1. – 2009. –Т. 20. – № 3. – С. 54.
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.
3. Цуканов А.С., Поспехова Н.И., Карпукhin А.В. Наследственная предрасположенность к раку желудка // Мед. генетика. – 2006. – № 4. – С. 16-21.
4. Шайн А.А. Онкология для студента и молодого врача. Рак органов пищеварения // Тюмень: «Скорпион». – 2000. – 368 с.
5. Bacani J.T., Soares M., Zwingerman R. CDH1/E-cadherin germline mutations in early-onset gastric cancer // J Med Genet. – 2006. – Vol. 43. – P. 867-872.
6. Becker K.F., Aktinson M.J., Reich U. et al. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas // Cancer Res. – 1994. – 54. – P. 3845-3852.
7. Berx G., Becker K.F., Hofler H. et al. Mutations of the human E-cadherin gene (CDH1) // Hum. Mutat. – 1998. – Vol. 12. – P. 226-237.
8. Brooks-Wilson A.R., Kaurah P., Suriano G. et al. Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria // J. Med. Genet. – 2005. – Vol. 41. – P. 508-17.
9. Caldas C., Carneiro F., Castedo S. et al. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management // J. Med. Genet. – 1999. – Vol. 36. – P. 873-880.
10. Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumor-suppressor gene // Trends biochem. Sci. – 1999. – Vol. 24. – P.73-76.
11. Fearnhead N.S., Winney B., Bodmer W.F. Rare variant hypothesis for multifactorial inheritance: susceptibility to colorectal adenomas as a model // Cell Cycle. – 2005. – Vol. 4. – P. 521-525.
12. Fitzgerald R., Hardwick R., Huntsman D. et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research // J. Med. Genet. -2010 – Vol. 47. – P. 436-444.
13. Suriano G., Yew S., Ferreira P. et al. Characterization of a recurrent germ line mutation of the E-cadherin gene: implications for genetic testing and clinical management // Clin. Cancer Res. – 2005. – Vol. 11. – P. 5401-5409.
14. Graziano F., Humar B., Guilford P. The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice // Ann. Oncol. – 2003. – Vol. 14. – P. 1705-1713.
15. Guilford P., Hopkins J., Harraway J. et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer // Nature – 1998. Vol. – 392. – P. 402-405.
16. Keller G., Vogelsang H., Becker I. et al. Germline mutations of the E-cadherin(CDH1) and TP53 genes, rather than of RUNX3 and HPP1, contribute to genetic predisposition in German gastric cancer patients // J. Med. Genet. – 2004. – Vol. 41. – P. 89-93.
17. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification // Acta Pathol. Microbiol. Scand. – 1965. – Vol. 64. – P. 31-49.
18. Lynch H.T., Grady W., Suriano G. et al. Gastric Cancer: New Genetic Developments // J. Surg. Oncology . – 2005. – Vol. 90. – P. 114-133.
19. Oliveira C., Ferreira P., Nabais S. et al. E-Cadherin (CDH1) and p53 rather than SMAD4 and caspase-10 germline mutations contribute to genetic predisposition in Portuguese gastric cancer patients // Europ. J. Cancer. – 2004. – Vol. 40 – P. 1897-18903.
20. Oliveira C., Pinheiro H., Figueiredo J. et al. E-Cadherin Alterations in hereditary disorders with emphasis on hereditary diffuse gastric progress // Molec. Biol. Translation. Science – 2013. – Vol. 116. - P. 337-359.
21. Oliveira C., Seruka R., Caldas C. et al. Genetic screening for HDGC // Rev. Mol. Diagn. – 2003. – Vol. 3. – P. 201-215.
22. Zhang Y., Liu X., Fan Y. et al. Germline mutations and polymorphic variants in MMR, E-cadherin and MYH genes associated with familial gastric cancer in Jiangsu of China // Int. J. Cancer – 2006. – Vol.119 – P. 2592-2596.

*A.S.Tsukanov¹, Yu.A.Shelygin¹, V.N.Kashnikov¹,
S.A.Frolov¹, L.N.Lyubchenko², V.P.Shubin¹,
A.V.Karpukhin³, T.A.Muzaffarova³, N.I.Pospekhova¹*

**Molecular genetics study of hereditary
predisposition to diffuse gastric cancer patients
in Russian patients**

¹ State Research Center of Coloproctology

² N.N.Blokhin Russian Cancer Research Center
Moscow

³ Medical Genetics Research Center

About 3% of cases of gastric cancer (GC) cases are due to hereditary predisposition. Molecular causes of inherited predisposition to diffuse GC among Russian patients have not been studied. In the present work there was performed the molecular genetics study in 9 probands with signet-ring cell GC. Search of hereditary mutations was conducted in a suppressor gene of diffuse GC — the gene CDH1. We have discovered a new hereditary mutation (c.1005delA) and one rare variant (s.2253C> T). Frequency of hereditary mutations in sample of patients Russian was 1/9 (11,1%).

Поступила в редакцию 20.05. 2013