

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ И
МЕДИЦИНСКОЙ РАДИОЛОГИИ им. Н.Н. АЛЕКСАНДРОВА»

УДК 616.34–006.6–056.7:577.23(043.3)(476)

ГУЛЯЕВА
Юлия Васильевна

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННОГО
НЕПОЛИПОЗНОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА У ЖИТЕЛЕЙ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 14.01.12 – онкология

Минск, 2016

Научная работа выполнена в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

Научный руководитель: Смолякова Раиса Михайловна, доктор биологических наук, доцент, заведующая Республиканской молекулярно-генетической лабораторией канцерогенеза государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

Официальные оппоненты: Мельнов Сергей Борисович, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры экологической и молекулярной генетики учреждения образования «Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета»

Силин Аркадий Евгеньевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной генетики научного отдела государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»

Оппонирующая организация: учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Защита состоится 1 июня 2016 г. в 12 ч. на заседании совета по защите диссертаций Д 03.12.01 при государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» (223040, Минский р-н, агр. Лесной, e-mail: NArtemova@omr.med.by, тел. +375173899561).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова».

Автореферат разослан «___» апреля 2016 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций
доктор медицинских наук, доцент

Н.А. Артемова

ВВЕДЕНИЕ

Рак толстой кишки (РТК) занимает одну из лидирующих позиций среди онкологических заболеваний. Ежегодно в мире диагностируется около одного миллиона новых случаев колоректального рака (КРР). В структуре онкологической заболеваемости в мире КРР у мужчин занимает 3-е место, у женщин – 2-ое. Уровень заболеваемости РТК в большинстве европейских стран находится в пределах 20-30 на 100 000 жителей. Высокие показатели заболеваемости отмечены в Словакии (42,7), Дании (40,5) и Нидерландах (40,2). При этом отношение смертности к заболеваемости существенно отличается и варьирует в пределах от 30,7% (Канада) до 60,2% (Российская Федерация).

В Республике Беларусь в период 2005-2014 годы наблюдался рост заболеваемости злокачественными новообразованиями. С 2008 года отмечено стойкое увеличение заболеваемости – более 40 000 случаев, в 2014 году данный показатель достиг 45 887. В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями в Республике Беларусь КРР составляет 10,3%. При этом показатели заболеваемости за 2005-2014 годы имели неуклонную тенденцию к росту с 19,8 до 27,1 на 100 000 жителей, независимо от половой принадлежности: у мужчин данный показатель увеличился с 19,2 до 26,0 на 100 000 мужчин и у женщин – с 20,4 до 28,0 на 100 000 женщин. Число вновь выявленных случаев увеличилось на 16,8% по сравнению с 2008 годом и составило 4655 случаев в 2014 году, 98,5% случаев подтверждены морфологически. Из этого числа 57,4% КРР выявлены на I-II стадиях. Несмотря на это, своевременная диагностика остается актуальным и важным аспектом данной патологии – 28,5% пациентов прожили менее года с момента установления диагноза.

КРР в большинстве случаев является спорадической формой рака. Доля наследственно обусловленных форм КРР составляет до 15% от всех злокачественных новообразований толстой кишки.

Наиболее часто встречаемыми формами наследственного поражения толстой кишки являются семейный аденоматозный полипоз (САП), частота развития рака на фоне которого составляет около 100%, и наследственный неполипозный колоректальный рак (ННКРР) или синдром Линча. Частота встречаемости ННКРР в популяции составляет 1:500 – 1:1000, что делает этот синдром одним из самых частых наследственных заболеваний.

В основе патогенеза ННКРР лежат молекулярные нарушения в генах эксцизионной системы репарации оснований ДНК (mismatch repair, MMR). В опухолевых клетках дефект репарации проявляется в виде нестабильности длины микросателлитных повторов (микросателлитная нестабильность (МСН)). К настоящему времени идентифицировано 7 основных генов, ассоциированных с развитием синдрома Линча: hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS1, hPMS2, hMSH3 и EHO1. Основная доля мутаций (около 90%) приходится на гены hMLH1 и hMSH2,

тогда как hMSH6 и PMS2 затрагиваются не часто и, как правило, ассоциированы с менее выраженным семейным анамнезом. Кроме того, у некоторых пациентов, соответствующих клиническим критериям ННКРР, вообще не удастся обнаружить мутации в известных MMR-генах.

Раннюю диагностику КРР до настоящего времени нельзя считать удовлетворительной, т.к. у каждого третьего пациента при выявлении КРР отмечается генерализация опухолевого процесса. Причиной сложившейся ситуации является низкая выявляемость на ранних этапах развития опухоли.

Диагностика ННКРР представляет собой сложную задачу и складывается из тщательного анализа семейной истории с последующим проведением молекулярно-генетического тестирования. Первым этапом молекулярно-генетической диагностики обычно является молекулярный тест образца опухолевой ткани, полученной в ходе биопсии или операции, с целью определения МСН. Согласно данным литературы, тест на МСН оказывается положительным более чем в 90% случаев синдрома Линча. Примерно в 8-15% спорадических случаев КРР МСН-тест также может быть позитивным. Именно поэтому выявление МСН хотя и указывает на возможное наличие ННКРР, тем не менее, не является абсолютным и достоверным признаком этой формы рака.

Вместе с тем, наличие МСН является показанием к поиску наследственных мутаций в генах системы репарации ДНК. Лишь определение генетических повреждений позволяет с уверенностью диагностировать ННКРР. В западных странах, такой подход к диагностике ННКРР-синдрома активно внедряется в клиническую практику. В Республике Беларусь, напротив, алгоритмов диагностики ННКРР до настоящего времени не существует. Данная проблема является особенно актуальной ввиду того, что пациенты с синдромом Линча, в отличие от спорадического КРР, имеют более благоприятный прогноз, меньшую частоту метастазирования, свои особенности чувствительности к различным группам химиопрепаратов.

Отдельной проблемой является разработка профилактических программ для родственников пациентов с ННКРР. Известно, что кумулятивный (накопленный) риск развития рака у родственников пациентов с ННКРР в возрасте до 70 лет составляет 91% для мужчин и 69% – для женщин. Риск заболеть КРР у мужчин в 2 раза выше, чем у женщин (74% против 30% соответственно). У женщин из этих семей риск развития рака эндометрия составляет 42%.

Отсутствие точных данных о генетических механизмах предрасположенности к развитию КРР сдерживает развитие теоретически обоснованной медико-генетической консультации и ее практических перспектив – разработку ранней диагностики, своевременного лечения, профилактики и наблюдения членов семей с высоким риском развития аналогичного заболевания.

Следует отметить, что до настоящего времени в современной литературе

нет оценки спектра наследственных мутаций в генах MMR у пациентов из числа жителей Республики Беларусь, соответствующих клиническим критериям НКРР.

Таким образом, вышеизложенное подтверждает необходимость проведения клинико-генетических исследований КРР и разработку научно-обоснованных рекомендаций для медико-генетического консультирования семей с данной проблемой, оценки вклада наследственных факторов в возникновение КРР, поиска маркеров наследственной предрасположенности к развитию НКРР.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами. Работа выполнена в рамках задания Белорусского фонда фундаментальных исследований: «Изучить молекулярно-генетические нарушения при наследственном неполипозном раке толстой кишки в белорусской популяции» (номер госрегистрации 20131750 от 8 августа 2013 г.), выполняемого со II кв. 2013 г. по II кв. 2015 г. на базе Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова».

Цель исследования – повысить эффективность диагностики наследственного неполипозного колоректального рака у пациентов, страдающих колоректальным раком, из числа жителей Республики Беларусь.

Задачи исследования:

1. Определить панель микросателлитных маркеров генетической нестабильности у пациентов, страдающих колоректальным раком, для диагностики наследственного неполипозного колоректального рака и провести анализ молекулярно-генетического профиля у данной категории пациентов.

2. Выявить частоту встречаемости микросателлитной нестабильности и провести сравнительный анализ молекулярно-генетического профиля и клинико-морфологической характеристики опухоли у пациентов, страдающих колоректальным раком, при первично-множественных злокачественных новообразованиях.

3. Установить молекулярные нарушения в генах MLH1 и MSH6, влияющие на риск развития наследственного неполипозного колоректального рака у пациентов и пробандов из числа жителей Республики Беларусь.

4. Дать рекомендации практическому здравоохранению по молекулярно-генетическому определению предрасположенности к развитию наследственного неполипозного колоректального рака.

Научная новизна. Впервые определена панель микросателлитных маркеров, обладающая 100% диагностической чувствительностью и специфичностью, для диагностики наследственного неполипозного колоректального рака у пациентов

из числа жителей Республики Беларусь. Новыми являются данные по частоте встречаемости микросателлитной нестабильности в аденокарциноме толстой кишки с наследственным характером заболевания у пациентов при первично-множественных формах злокачественных новообразований. Впервые установлены молекулярно-генетические факторы, оказывающие влияние на риск развития наследственного неполипозного колоректального рака у пациентов и пробандов. Разработан комплекс мероприятий для диагностики синдрома Линча, в том числе позволяющий выделить группу высокого риска развития наследственного неполипозного колоректального рака у пробандов из числа жителей Республики Беларусь.

Положения, выносимые на защиту.

1. Разработанная панель маркеров микросателлитной нестабильности, включающая микросателлитные локусы генов hMSH2 (Bat-26, D2S123) и APC (D5S346), обладает 100% диагностической чувствительностью и специфичностью для диагностики наследственного неполипозного колоректального рака у пациентов из числа жителей Республики Беларусь.

2. Для пациентов, страдающих наследственным неполипозным колоректальным раком при первично-множественной форме заболевания, характерна генетическая нестабильность микросателлитных локусов генов BRCA1, hMSH2 и APC в аденокарциноме толстой кишки. Положительный статус микросателлитной нестабильности в опухолевой ткани пациентов, страдающих наследственным неполипозным колоректальным раком при первично-множественном злокачественном поражении, выявлен в 100% случаев.

3. Наследственный неполипозный колоректальный рак характеризуется наличием мутаций в генах эксцизионной системы репарации ДНК, приводящих к изменению функциональной активности белков MLH1 и MSH6.

Личный вклад соискателя ученой степени. В проведенном исследовании автором осуществлен всесторонний анализ отечественной и зарубежной литературы по проблеме исследования. Лично автором проведены молекулярно-генетические исследования по оценке микросателлитной нестабильности, выявлению мутации в генах BRAF, MLH1, MSH6. Иммуногистохимическим методом выполнено определение экспрессии белков MLH1 и MSH6. Проанализированы клинические и молекулярно-генетические данные, проведена их статистическая обработка и изложение полученных результатов в виде диссертационной работы. Постановка цели, задач и положений, выносимых на защиту, интерпретация полученных результатов проведены совместно с научным руководителем д.б.н., доцентом Р.М. Смоляковой.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов. Основные положения и результаты диссертационной работы явились предметом докладов, тезисов, сообщений на республиканских, международных

конференциях, конгрессах: IV съезде онкологов Республики Беларусь (3–5 ноября 2011 г., Минск); научной конференции Белорусского государственного медицинского университета (2012–2014 г.г., Минск); «7-ом Центральном европейском регионарном съезде» (2012 г., Шиофок, Венгрия), заседании общественного объединения «Белорусское общество онкологов» (2013 г., Минск); «25-ом Европейском конгрессе патологов» (2013 г., Лиссабон, Португалия), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014», (2014 г., Москва, РФ), VIII Съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (2014 г., Казань, Россия). Разработан метод, утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь и внедрена в структурных подразделения РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова инструкция по применению «Метод молекулярно-генетической диагностики наследственного неполипозного колоректального рака» [10].

Опубликование результатов диссертации. Научные выводы и основные результаты диссертации опубликованы в 10 научных работах, в том числе в 4 статьях в рецензируемых научных журналах из перечня изданий, рекомендованных ВАК Беларуси, соответствующих пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь (2,4 авторских листа), 5 тезисах докладов научных конференций и одной инструкции по применению утверждённой Министерством здравоохранения Республики Беларусь.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, четырех глав, заключения и библиографического списка, включающего 110 литературных источников (из них собственных публикаций соискателя 10) и 3 приложений. Работа изложена на 107 страницах (без учета библиографического списка и приложений), содержит 19 таблиц и иллюстрирована 42 рисунками.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материал и методы клинического исследования. Работа основана на анализе данных историй болезни 584 пациентов, страдающих колоректальным раком, находившихся на лечении в РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова в период 2006–2012 гг. Выборка пациентов осуществлялась на основании соответствия Амстердамским критериям: 1) колоректальный рак, диагностированный в возрасте до 55 лет; 2) наличие первично-множественного процесса, одним из которых является колоректальный рак; 3) наличие в анамнезе родственников с колоректальным раком или Линч-ассоциированной опухолью (рак эндометрия, яичников, желудка, печени, тонкого кишечника, почечная карцинома и др.).

На основании анализа историй болезни в исследование были включены 122 пациента, согласно соответствию одному и более выше перечисленным критериям. Материалом исследования послужили образцы опухолевой ткани и периферической крови пациентов, включенных в исследование.

Из всех обследованных у 105 (86,1%) пациентов диагностирован колоректальный рак, первично-множественные злокачественные заболевания выявлены у 17 (13,9%) пациентов. Возраст пациентов, включенных в исследование, варьировал от 25 до 60 лет, средний возраст составил $49,6 \pm 7,7$ лет.

В группе пациентов с первично-множественной формой заболевания, одно из которых локализовано в толстой кишке, у 9 (52,9%) пациентов выявлены синхронные новообразования, у 8 (47,1%) – метакронные опухоли. У 9 (52,9%) пациентов оба рака были локализованы в толстой кишке, у 5 (29,4%) пациентов локализация опухолевого процесса соответствовала толстой кишке и органам женской репродуктивной системы, у троих (17,7%) – одно злокачественное заболевание было локализовано в толстой кишке и второе – в других органах.

Изучение экспрессии тканевых антигенов выполнено иммуногистохимическим методом. Фрагментным анализом определен уровень микросателлитной нестабильности с использованием маркеров D2S123, D5S346, D17S250, Bat-25, Bat-26, NR-21, NR-24, NR-27, определение мутаций в гене BRAF в опухолевой ткани и генах MLH1 и MSH6 в периферической крови осуществлялось методом секвенирования на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, США). Подбор, адаптация и отработка условий фрагментного анализа и секвенирования нами осуществлялись самостоятельно. Получено два международных сертификата качества молекулярно-генетических исследований.

Анализ результатов выполнен с использованием компьютерных пакетов статистических программ SPSS (версия 17.0.0, США), Excel 2009 («Microsoft Office»). Статистическая обработка качественных признаков выполнена с использованием непараметрического анализа (точный критерий Фишера, Хи-квадрат). Для микросателлитных маркеров определены показатели диагностической значимости (диагностической чувствительности (ДЧ), диагностической специфичности (ДС), диагностической эффективности (ДЭ)) путем переклассификации обучающей выборки с оценкой интегральной диагностической информативности. При всех видах статистического анализа различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты клинического исследования

Результаты определения микросателлитной нестабильности у пациентов, страдающих колоректальным раком. Классификация по критерию микросателлитной нестабильности проводилась исходя из рекомендаций Рабочей группы Национального института рака (США) с использованием панели,

состоящей из 8 микросателлитных маркеров. Высоким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI-high) обладала опухоль, если образец имел нестабильность числа tandemных повторов в 3 и более маркерах. В группу низкого уровня микросателлитной нестабильности (MSI-low) относили образцы с нестабильностью микросателлитов в 1 и/или 2 маркерах. Опухоль считали стабильной, если отсутствовала вариабельность длины микросателлитов.

Микросателлитная нестабильность в ткани колоректального рака пациентов, включенных в исследование согласно соответствию Амстердамским критериям, выявлена у 75 (61,5%) из 122 пациентов, при этом у 66 (54,1%) пациентов нестабильность установлена по 2 и более маркерам. Возникновение микросателлитной нестабильности может происходить при спорадической форме колоректального рака из-за возникновения мутаций в 600 кодоне 15 экзона гена BRAF. Для исключения не наследственных форм всем пациентам с микросателлитной нестабильностью в опухолевой ткани выполнено определение нуклеотидной последовательности 15 экзона гена BRAF.

У 5 пациентов выявлены мутации BRAF (V600E) из 75 пациентов с микросателлитной нестабильностью в опухолевой ткани (рисунок 1).

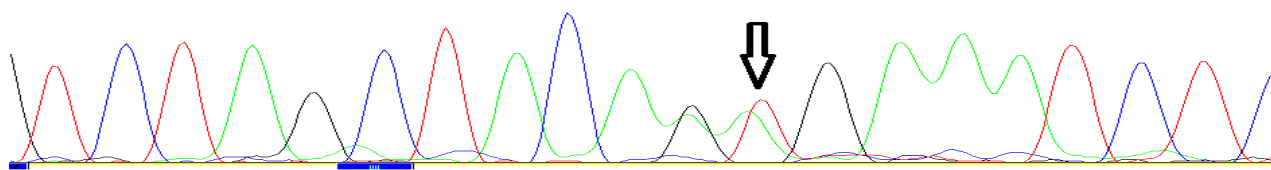


Рисунок 1. – Генетическое изменение 15 экзона гена BRAF (V600E)

Пациенты с мутацией BRAF (V600E) были исключены из исследования при последующем проведении анализа результатов, т. к. возникновение нестабильности микросателлитов в опухолевой ткани в данных случаях обусловлено изменением нуклеотидной последовательности гена BRAF.

Наличие положительного статуса микросателлитной нестабильности в опухолевой ткани толстой кишки пациентов, ассоциированное с развитием наследственного неполипозного колоректального рака, диагностировано у 70 (57,4 %) из 122 пациентов.

Анализ распределения пациентов с микросателлитной нестабильностью в опухолевой ткани показал, что преобладающей возрастной группой были пациенты в возрасте 45–55 лет – составили 50% от всех пациентов с положительным статусом нестабильности микросателлитных маркеров, при этом пациенты в возрасте менее 45 лет представлены в исследовании в 31,4% случаев, старше 55 лет – 18,6 % случаев.

Отсутствие микросателлитной нестабильности выявлено у 47 (38,5%) пациентов. Низкий уровень микросателлитной нестабильности определен у 43/70 (61,4%) пациентов. Статус MSI-low с вовлечением двух маркеров определен у 31 (72,1%) из 43 пациентов, в частности, у 8/31 (25,8%) отмечена нестабильность

микросателлитных маркеров D2S123 и D5S346 и у 13/31 (41,9%) пациентов – маркеров D2S123 и Bat-26. Высокий уровень микросателлитной нестабильности выявлен у 27 (38,6%) из 70 пациентов. В 55,6% случаев определен статус MSI-high с вовлечением трех маркеров, в 33,3% случаев – с вовлечением четырех маркеров (рисунок 2).

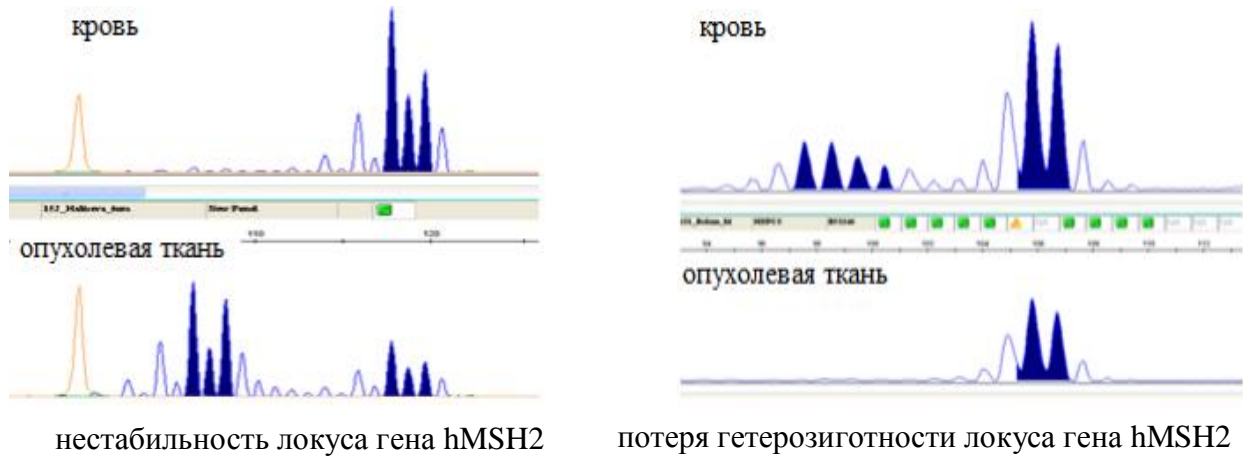


Рисунок 2. – Нестабильность микросателлитного локуса 2p16-p21 гена hMSH2

При анализе результатов установлено, чтоотягощенный онкологический анамнез отмечен у 53 (75,7%) из 70 пациентов. При этом 26 (49,1%) родственников страдали злокачественным поражением толстой кишки, у 19 (35,8%) родственников диагностированы Линч-ассоциированные злокачественные новообразования, у 8 (15,1%) родственников – опухоли других локализаций (рисунок 3).

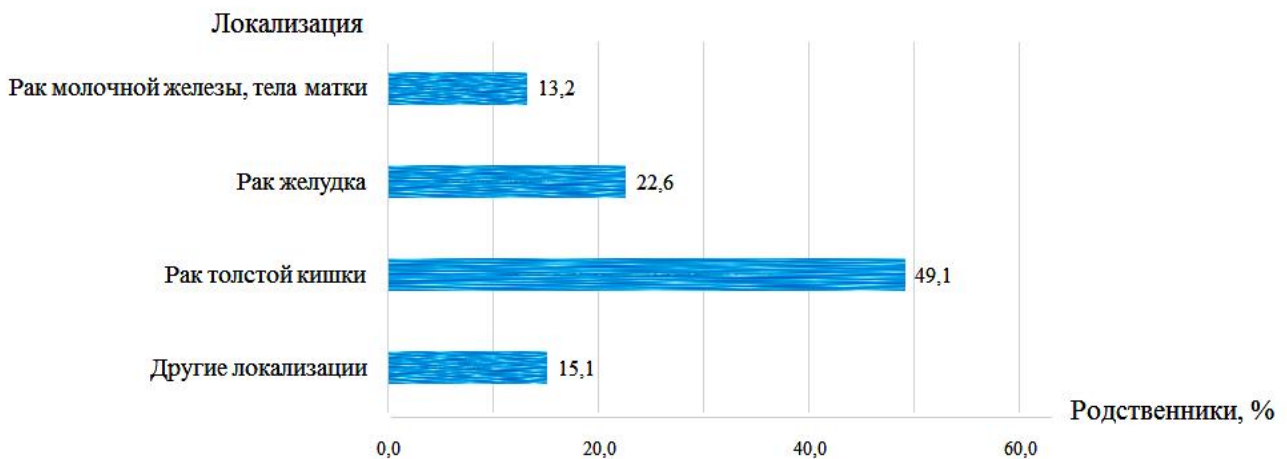


Рисунок 3. – Распределение злокачественных новообразований у родственников пациентов с положительным статусом микросателлитной нестабильности

При выполнении анализа полученных результатов молекулярно-генетических исследований были рассчитаны показатели диагностической информативности микросателлитных маркеров: диагностическая чувствительность, специфичность и эффективность для каждого маркера и их сочетания (таблица 1).

Таблица 1. – Показатели диагностической информативности микросателлитных маркеров

Маркер	Статистические параметры								
	чувствительность, %	95% доверительный интервал	p	эффективность, %	95% доверительный интервал	p	специфичность, %	95% доверительный интервал	p
D2S123	57,1	0,393-0,517	0,0033	74,4	0,678-0,744	0,0018	100	0,918-1,0	0,0018
D5S346	55,7	0,502-0,557	0,0025	73,5	0,669-0,735	0,0029	100	0,918-1,0	0,0029
Bat-25	16,9	0,121-0,169	0,0029	50,0	0,442-0,50	0,027	100	0,918-1,0	0,027
Bat-26	76,1	0,707-0,761	0,0032	85,6	0,792-0,856	0,0018	100	0,931-1,0	0,0013
D5S346+ Bat26	64,1	0,549-0,641	0,0019	83,7	0,754-0,837	0,0014	100	0,936-1,0	0,0026
D17S250+ Bat26	63,6	0,489-0,636	0,0011	88,4	0,790-0,884	0,0011	100	0,933-1,0	0,0014
D2S123+ D17S250+ Bat-26	80,0	0,603-0,800	0,0023	95,2	0,856-0,952	0,0011	100	0,937-1,0	0,0023
D5S346+ D17S250+ Bat-26	83,3	0,442-0,833	0,0021	98,1	0,893-0,981	0,0021	100	0,945-1,0	0,0011
D2S123+ D5S346+ D17S250+ Bat-25	73,6	0,589-0,736	0,0019	87,4	0,790-0,874	0,0011	100	0,933-1,0	0,0013
D2S123+ D5S346+ D17S250+ Bat-26	83,3	0,442-0,833	0,0013	98,1	0,893-0,981	0,0021	100	0,945-1,0	0,0018
D2S123+ D5S346+ D17S250+ Bat-25+ Bat-26	100	0,815-1,0	0,0020	100	0,915-1,0	0,0013	100	0,945-1,0	0,0019
D2S123+ D5S346+ Bat-26	100	0,825-1,0	0,0018	100	0,911-1,0	0,0020	100	0,937-1,0	0,0017

Полученные нами данные свидетельствуют о высоких показателях диагностической информативности изучаемых маркеров микросателлитной нестабильности для дифференциальной диагностики наследственного неполипозного колоректального рака. Диагностическая чувствительность в 100% (95% ДИ [0,825–1,0]) и диагностическая специфичность в 100% (95% ДИ [0,937–1,0]) могут быть получены при сочетанном использовании микросателлитных маркеров D2S123, D5S346 и Bat-26 ($p < 0,002$). Использование панели, включающей данные маркеры, позволит проводить молекулярные исследования при подозрении наследственного неполипозного колоректального рака [10].

Наследственный неполипозный колоректальный рак диагностирован в 57,4% случаев по наличию микросателлитной нестабильности в ткани колоректального рака у пациентов, включенных в исследование согласно соответствию клиническим Амстердамским критериям.

Таким образом, анализ клинических данных и результатов молекулярно-генетических исследований показал, что микросателлитная нестабильность в опухолевой ткани представлена изменением длины микросателлитных повторов с вовлечением двух и более маркеров, характерна для пациентов в молодом возрасте (до 55 лет) и с отягощенным онкологическим анамнезом.

Оценка статуса микросателлитной нестабильности в ткани колоректального рака у пациентов при первично-множественном характере злокачественного процесса. Пациенты, включенные в исследование, с первично-множественными заболеваниями представлены в работе в 13,9% случаев. Микросателлитная нестабильность в ткани колоректального рака при первично-множественном поражении выявлена у всех пациентов (100%). Высокий уровень нестабильности установлен у 11 (64,7%) пациентов, низкий уровень – у 6 (35,3%) пациентов. При анализе результатов молекулярных исследований определена частота встречаемости микросателлитной нестабильности при первично-множественном характере опухолевого процесса (рисунок 4).

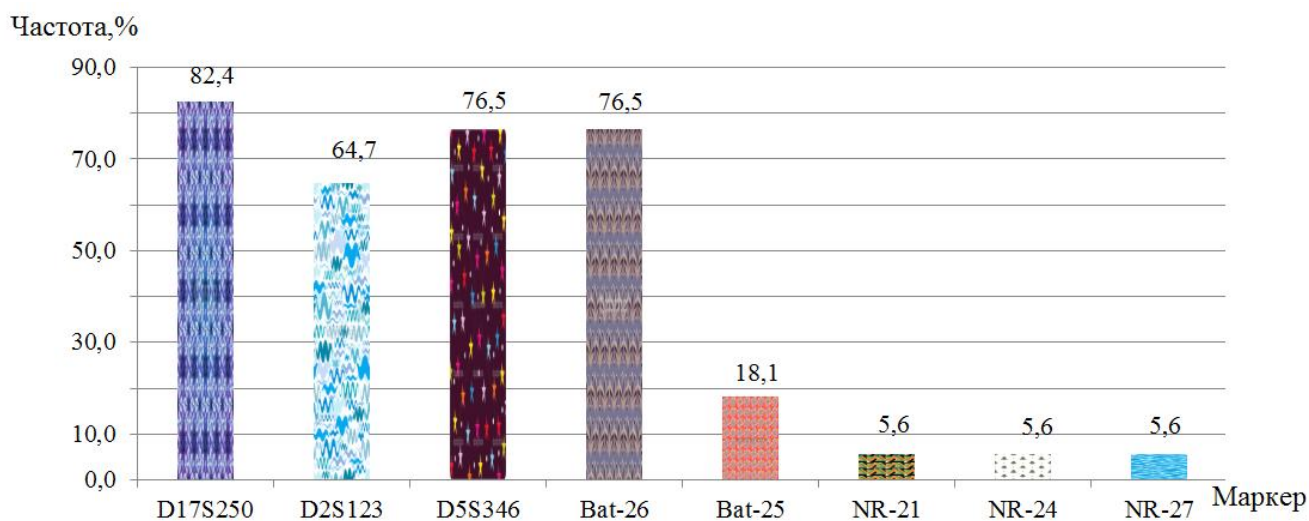


Рисунок 4. – Частота встречаемости микросателлитных маркеров в опухолевой ткани пациентов с первично-множественным характером заболевания

Нестабильность микросателлитного участка локуса 17q11.2-q12 гена *BRCA1* выявлена у 14 (82,4%) пациентов (ДЧ=82,4% (95% ДИ [0,647–0,824]), ДС=100% (95% ДИ [0,936–1,0]) и ДЭ=95,3% (95% ДИ [0,859–0,953]) ($p < 0,003$)). Микросателлитная нестабильность локуса 5q21-q22 гена *APC* определена у 13 (76,5%) пациентов (ДЧ=76,5% (95% ДИ [0,586–0,765]), ДС=100% (95% ДИ [0,935–1,0]) и ДЭ=93,8% (95% ДИ [0,842–0,938]) ($p < 0,004$)). Генетическая нестабильность микросателлитного локуса 2p16 гена *hMSH2* установлена у 13 (76,5%) пациентов (ДЧ=76,5% (95% ДИ [0,586–0,765]), ДС=100% (95% ДИ [0,935–1,0]) и ДЭ=93,8% (95% ДИ [0,842–0,938]) ($p < 0,004$)).

Молекулярно-генетические нарушения системы репарации ДНК приводят к накоплению клеток с мутантным статусом, что обуславливает возникновение первично-множественных форм злокачественных новообразований – положительный статус нестабильности микросателлитных локусов в ткани колоректального рака установлен в 100% случаев. При этом, у 100% родственников пациентов с первично-множественным характером заболевания отмечены Линч-ассоциированные злокачественные новообразования.

Определение нуклеотидной последовательности генов системы репарации ДНК у пациентов, страдающих колоректальным раком.

Определение нуклеотидной последовательности генов системы репарации ДНК выполнено всем пациентам, в опухолевой ткани которых определен положительный статус микросателлитной нестабильности.

У 25 (35,7%) из 70 пациентов определены мутации в генах MLH1 и MSH6. Выявлены как ранее встречающиеся и описанные в зарубежной литературе генетические изменения, так и впервые установленные генетические нарушения, специфические для жителей Республики Беларусь (рисунок 5).

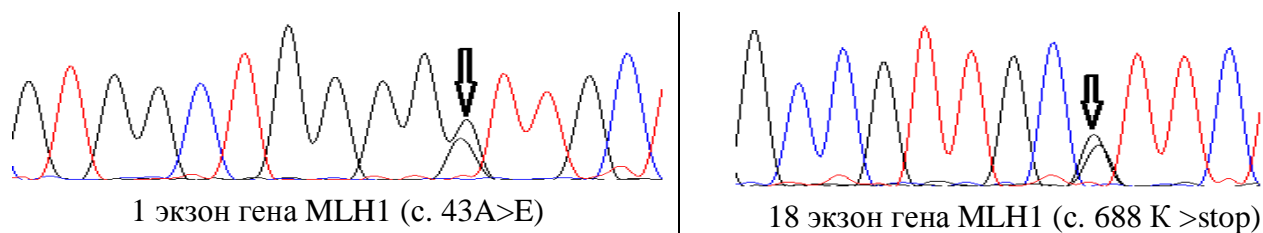


Рисунок 5. – Нуклеотидная последовательность генов системы репарации ДНК у пациентов, страдающих колоректальным раком

При анализе изменений в генах системы репарации ДНК установлено, что генетические поломки происходят в кодирующих областях изучаемых генов, приводящие к изменению аминокислотного состава в соответствующих белках и, как следствие, нарушению функциональной активности белков пострепликационной системы репарации ДНК. Однако, при проведении исследований нами установлены генетические нарушения, затрагивающие некодирующие участки генов данной системы в виде делеций нуклеотидов в интронах, которые приводят к изменению нуклеотидной последовательности в следующих за ними экзонах. Качественный анализ нуклеотидной последовательности генов эксцизионной системы репарации ДНК показал, что 3 мутации выявлены в гене MSH6 и 8 мутаций – в гене MLH1, генетические изменения в интронах представлены делециями пар нуклеотидов (таблица 2).

Таблица 2. – Характеристика специфических генетических изменений системы репарации ДНК

Ген		Генетическое изменение	
название	экзон	вид мутации	функциональное значение
MLH1	1	с. 43A>E	не установлено
MLH1	8	с.205 V>G	не установлено
MLH1	8	с.217 I>I	полиморфизм
MLH1	8	с. 219 I>V (RS1799977)	замена аминокислоты
MLH1	17	с. 642 P>L	не установлено
MLH1	17	с. 649 V>V	полиморфизм
MLH1	18	с. 678 K>K	полиморфизм

Продолжение таблицы 2.

MLH1	18	с. 688 K>stop	терминация синтеза
MSH6	4	с. 399 L>stop	терминация синтеза
MSH6	4	с. 557 S>stop	терминация синтеза
MSH6	5	с. 25 R>L	замена аминокислоты
MLH1	интрон	делеции в 1, 8, 17, 18 интронах	терминация синтеза
MSH6	интрон	делеции в 4, 5 интронах	терминация синтеза

Патогенность пяти обнаруженных мутаций не вызывает сомнений, т. к. три мутации (MLH1 (с. 688 K>stop), MSH6 (с. 399 L>stop, с. 557 S>stop)) приводят к преждевременному обрыву синтеза белка и две мутации (MLH1 (с. 219 I>V (RS1799977)) и MSH6 (с. 25 R>L)) вызывают изменение функциональной активности в связи с заменой аминокислот в белке. Мутации в 8, 17 и 18 экзонах гена MLH1 являются однонуклеотидными заменами, и 5 выявленных генетических изменений не описано ранее в литературе. Генетические изменения в интронах представлены делециями более 5 пар оснований, приводящими к возникновению стоп-кодонов в следующих за ними экзонах.

Комплекс мероприятий для диагностики наследственного неполипозного колоректального рака. На основании выполненных молекулярных исследований и анализа полученных данных разработан комплекс мероприятий для диагностики наследственного неполипозного колоректального рака.

I блок. Первый блок заключается в сборе анамнеза: 1) манифестация колоректального рака до 55 лет; 2) наличие колоректального рака или Линч-ассоциированных заболеваний (рак яичников, тела матки, эндометрия, желудка, поджелудочной железы, гортани, молочной железы) у родственников I и II степени родства; 3) наличие первично-множественных новообразований толстой кишки и/или Линч-ассоциированных заболеваний (рак тела матки, эндометрия, желудка, поджелудочной железы, гортани, молочной железы, яичников).

Одновременное наличие двух и более критериев является основанием для предположения наследственной формы колоректального рака у пациента. Далее необходимо информировать пациента о возможном наличии у него наследственного неполипозного колоректального рака и получить его согласие на проведение молекулярно-генетических исследований.

II блок. Второй блок включает в себя проведение молекулярно-генетических исследований:

1. Определение статуса микросателлитной нестабильности в опухолевой ткани с использованием разработанной панели микросателлитных маркеров Bat-26, D2S123 (ген hMSH2) и D5S346 (ген APC). К высокому уровню микросателлитной нестабильности относят опухоли, если образец имеет нестабильность tandemных повторов в двух или трех маркерах из разработанной

панели. В группу низкого уровня микросателлитной нестабильности относятся образцы, которые имеют нестабильность только в одном из тестируемых маркеров. Опухоль имеет стабильный статус в случае отсутствия вариабельности по длине микросателлитного локуса [10].

2. Определение мутаций 15 экзона гена BRAF в опухолевой ткани. Возникновение микросателлитной нестабильности отмечается при спорадических формах колоректального рака, которое возникает вследствие наличия мутации гена BRAF (V600E). Для исключения не наследственных форм колоректального рака всем пациентам с микросателлитной нестабильностью необходимо выполнить определение мутаций в гене BRAF. Наличие BRAF (V600E) свидетельствует о спорадическом характере колоректального рака. В случае отсутствия мутации BRAF (V600E), колоректальный рак у пациента является наследственно обусловленной формой и относится к синдрому Линча.

3. Определение мутаций в генах MLH1 и MSH6 в периферической крови пациентов с наличием микросателлитной нестабильности для выявления мутаций, ответственных за развитие злокачественных новообразований в данной семье.

III блок. Третий блок включает в себя личное информирование пациента о результатах молекулярного анализа. В случае обнаружения мутаций в генах системы репарации ДНК у пациентов рекомендуется проведение анализа генов MLH1 и MSH6 кровным родственникам с целью выявления аналогичных генетических изменений, ответственных за развитие опухолевого процесса в данной семье. Исследование генов системы репарации ДНК целесообразно выполнять с использованием пары праймеров, генетические изменения в которых выявлены у пациента. В качестве биологического материала для молекулярного анализа у родственников используется венозная кровь.

IV блок. Четвертый блок включает в себя комплекс мероприятий, направленных на мониторинг пациентов и родственников. Программа мониторинга в отношении пациентов с подтвержденной наследственной формой колоректального рака, должна включать в себя выявление метахронных опухолей толстой кишки; выявление опухолей других локализаций (у мужчин – сочетание колоректального рака и рака желудка, гортани, у женщин – колоректального рака и рака эндометрия и/или яичников, молочной железы); разъяснение результатов молекулярного анализа и риска развития рака членам семьи. К основным задачам программы мониторинга родственников пациентов с подтвержденным синдромом Линча относится ранняя диагностика первичного колоректального рака и опухолей других локализаций (чаще органов женской репродуктивной системы).

В результате проведенного молекулярно-генетического исследования разработана программа диагностических мероприятий синдрома Линча у пациентов и пробандов (рисунок б).

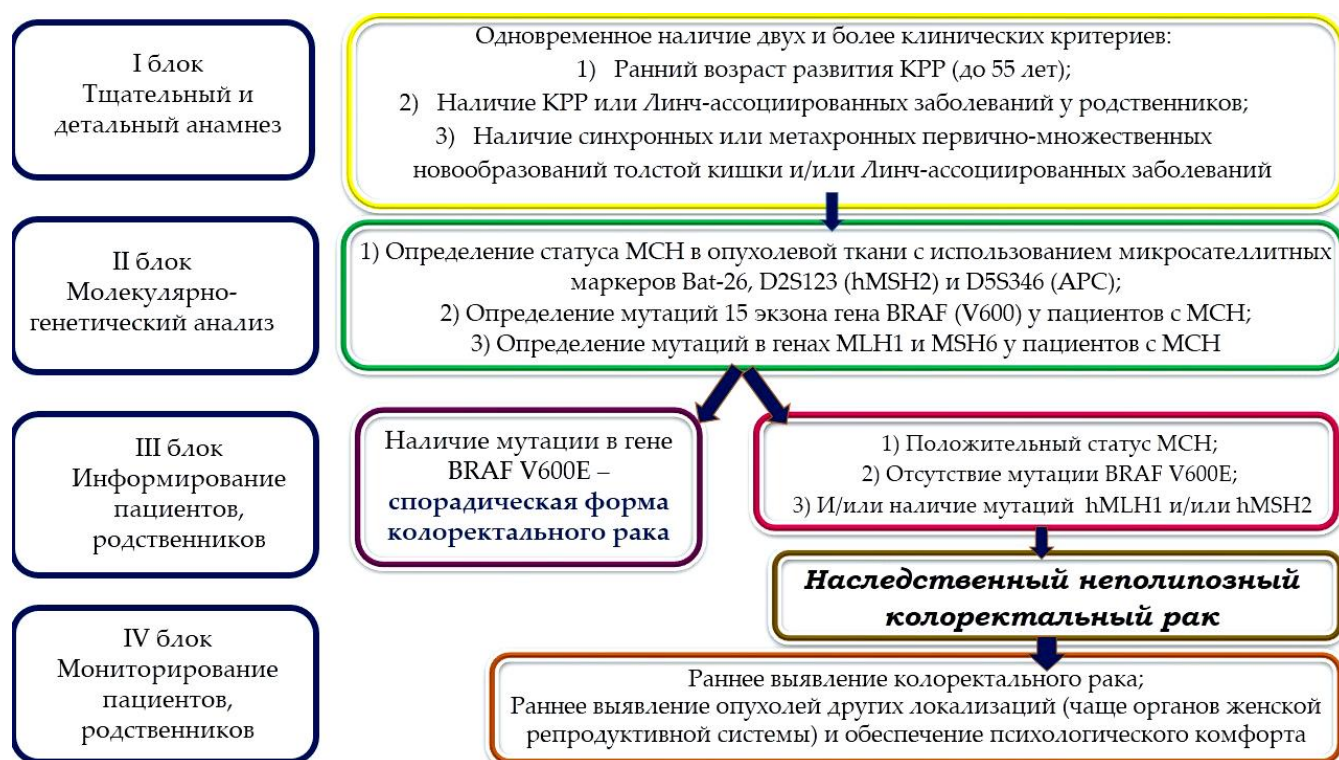


Рисунок 6. – Этапы диагностики наследственного неполипозного колоректального рака

При проведении анализа выполнено сравнение эффективности диагностики наследственного неполипозного колоректального рака на основе стандартного подхода с использованием клинических критериев (соответствие Амстердамским критериям) и комплексного подхода с проведением дополнительных молекулярно-генетических исследований. В качестве референсного метода использовано определение микросателлитной нестабильности панели Бетезда (D2S123, D5S346, D17S250, Bat-25, Bat-26) в ткани колоректального рака, диагностическая эффективность которого составляет 100% согласно рекомендациям ESMO.

Использование только Амстердамских критериев позволило отобрать 122 пациента с предположительным диагнозом синдрома Линча, в то время как использование разработанного комплекса позволило установить диагноз на основании молекулярно-генетических исследований у 70 (57,4%) из 122 пациентов. Разработанный комплекс способствует повышению диагностической информативности за счет исключения ложноположительных случаев соответствия критериям – у 52 (42,6%) пациентов диагноз наследственного неполипозного колоректального рака не подтвердился, первоначально злокачественное поражение толстой кишки которых отнесено к наследственной форме по соответствию Амстердамским критериям.

Использование разработанного комплекса позволит персонифицировать подход к обследованию пациентов, страдающих колоректальным раком, и ассоциированных пробандов из числа жителей Республики Беларусь. Кроме того,

применение предложенных диагностических мероприятий у пациентов, страдающих колоректальным раком при подозрении наследственной формы рака, позволит избежать гипердиагностику и исключить проведение не обоснованных дополнительных диагностических мероприятий, таких как колоноскопия, компьютерная томография и других инструментальных методов как у пациентов, так и у пробандов. Применение данного комплекса диагностических мероприятий у пробандов позволит выделить группу высокого риска развития злокачественного заболевания, разработать комплекс профилактических мероприятий и выявить заболевание на ранних стадиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Генетическая нестабильность микросателлитных локусов генов hMSH2 и APC является дифференциальным диагностическим критерием наследственного неполипозного колоректального рака у пациентов из числа жителей Республики Беларусь. Сочетанное использование микросателлитных маркеров Bat-26, D2S123 (hMSH2) и D5S346 (APC) для диагностики синдрома Линча у пациентов при подозрении наследственной формы онкологического процесса, обеспечивает диагностическую эффективность 100% (95% доверительный интервал [0,911-1,0]), диагностическую чувствительность 100% (95% доверительный интервал [0,825-1,0]) и диагностическую специфичность 100% (95% доверительный интервал [0,937-1,0]) ($p < 0,002$). Для пациентов, страдающих наследственным неполипозным колоректальным раком, характерно изменение длины микросателлитных локусов генов hMSH2 и APC [2, 3, 5].

2. Пациенты, страдающие наследственным неполипозным колоректальным раком, с генетической нестабильностью микросателлитных локусов генов BRCA1 (D17S250), hMSH2 (Bat-26) и APC (D5S346) имеют высокий риск развития первично-множественных форм злокачественных новообразований. Нестабильность микросателлитных маркеров в ткани колоректального рака при первично-множественном характере поражения выявлена в 100% случаев. Частота встречаемости микросателлитной нестабильности локуса BRCA1 (D17S250) определена в 82,4% случаев (диагностическая чувствительность 82,4% (95% доверительный интервал [0,647–0,824]), диагностическая специфичность 100% (95% доверительный интервал [0,936–1,0]) и диагностическая эффективность 95,3% (95% доверительный интервал [0,859–0,953]) ($p < 0,003$)), локуса APC (D5S346) – 76,5% случаев (диагностическая чувствительность 76,5% (95% доверительный интервал [0,586–0,765]), диагностическая специфичность 100% (95% доверительный интервал [0,935–1,0]) и диагностическая эффективность 93,8% (95% доверительный интервал [0,842–0,938]) ($p < 0,004$)) и локуса hMSH6 (Bat-26) – 76,5% случаев

(диагностическая чувствительность 76,5% (95% доверительный интервал [0,586–0,765]), диагностическая специфичность 100% (95% доверительный интервал [0,935–1,0]) и диагностическая эффективность 93,8% (95% доверительный интервал [0,842–0,938]) ($p < 0,004$)) [1, 6, 7].

3. Возникновение наследственных мутаций в кодирующих и некодирующих областях генов эксцизионной системы репарации ДНК ассоциировано с развитием наследственного неполипозного колоректального рака. Молекулярные изменения в генах системы репарации ДНК приводят к преждевременному обрыву синтеза цепи белка из-за возникновения стоп-кодонов (MLH1 (с. 688 K>stop), MSH6 (с. 399 L>stop) и MSH6 (с. 557 S> stop)) и нарушению функциональной активности белков за счет изменения аминокислотного состава (MLH1 (с. 219 I>V) (RS 1799977), MLH1 (с. 43A>E), MLH1 (с.205 V>G), MLH1 (с.642 P>L)) [4, 8, 9].

4. Разработан комплекс мероприятий для диагностики наследственного неполипозного колоректального рака у пациентов и пробандов из числа жителей Республики Беларусь, включающий сбор анамнеза, проведение молекулярно-генетических исследований по определению статуса микросателлитной нестабильности в ткани колоректального рака с использованием маркеров Bat-26, D2S123 и D5S346, определение нуклеотидной последовательности 15 экзона BRAF (V600) и генетических изменений MLH1 и MSH6. Использование разработанного комплекса диагностических мероприятий позволяет персонафицировать подход к наблюдению и обследованию пациентов, страдающих наследственным неполипозным колоректальным раком, и ассоциированных пробандов, за счет исключения ложноположительных случаев соответствия клиническим критериям [3, 4, 9, 10].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. С целью диагностики синдрома Линча у пациентов, страдающих колоректальным раком, при подозрении наследственного характера заболевания необходимо использовать комплекс мероприятий, включенный в разработанную программу диагностики наследственного неполипозного колоректального рака.

2. Для своевременного выявления колоректального рака молекулярное тестирование генов системы репарации ДНК должно быть рекомендовано родственникам пациентов, страдающих синдромом Линча, для определения молекулярных нарушений в генах MLH1 и MSH6.

3. Генетическое консультирование кровных родственников пациентов с ННКРР, основывается на определении мутаций в генах системы репарации ДНК, выявленных у пациента, и определении MLH1- и MSH6-ассоциированных пробандов с последующим составлением индивидуальных рекомендаций тактики диспансерного наблюдения [10].

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ**Статьи**

1. Смолякова, Р. М. Молекулярно-генетический профиль рака яичников: диагностическая и клиническая значимость / Р. М. Смолякова, Ю. В. Гуляева // Экологический вестник. – 2011. – № 3. – С. 51–56.
2. Смолякова, Р. М. Микросателлитная нестабильность в выявлении предрасположенности и ранней диагностике наследственного неполипозного рака толстой кишки / Р. М. Смолякова, Ю. В. Гуляева // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2012. – № 1. – С. 47–56.
3. Гуляева, Ю. В. Молекулярно-генетическое тестирование при наследственном неполипозном колоректальном раке / Ю. В. Гуляева, Р. М. Смолякова // Онколог. журн. – 2013. – Т. 7, № 2. – С. 86–92.
4. Гуляева, Ю. В. Генетические нарушения в системе репарации ДНК при наследственном неполипозном колоректальном раке / Ю. В. Гуляева // Здоровоохранение. – 2015. – № 6. – С. 15–20.

Тезисы докладов

5. Molecular profile for colorectal cancer in Belorussian population / Y. V. Hulyaeva, P. M. Smolyakova, V. T. Kohnuk, E. G. Morozh // Hot issues in molecular pathology : materials of Technology transfer in diagnostic pathology 7th Central European regional meeting, Siofok, Hungary, 14–16 May 2012 / Hungarian Div. Int. Acad. Pathol. – Siofok, 2012. – P. 31.
6. Advanced adenoid cystic carcinoma treated by imatinib mesylate: Report of five cases / M. Vozmitel, J. V. Guljaeva, S. Rjabceva, T. I. Nabebina, A. Dubrovskij // Virchows Archiv. – 2013. – Vol. 463, suppl. 2. – P. 169.
7. Vozmitel, M. Molecular markers analysis for hereditary nonpolyposis colorectal cancer in Belarusian population / M. Vozmitel, J. Guljaeva, R. Smolyakova // Virchows Archiv. – 2013. – Vol. 463, suppl. 2. – P. 316.
8. Гуляева, Ю. В. Статус микросателлитной нестабильности у пациентов при наследственном неполипозном колоректальном раке / Ю. В. Гуляева, Р. М. Смолякова // Злокачественные опухоли. – 2013. – № 2. – С. 139–140.
9. Гуляева, Ю. В. Анализ молекулярных маркеров при наследственном неполипозном колоректальном раке в белорусской популяции / Ю. В. Гуляева, Р. М. Смолякова, М. А. Возмитель // Молекулярная диагностика – 2014 : сб. трудов VIII Всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием, Москва, 18–20 марта 2014 г. / Под ред. акад. РАН В. И. Покровского. – М., 2014. – С. 58.

Инструкция по применению

10. Метод молекулярно-генетической диагностики наследственного неполипозного колоректального рака : инструкция по применению. Рег. № 122-1114 / ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» ; сост.: Р. М. Смолякова, Ю. В. Гуляева. – Минск, 2014. – 10 с.

РЭЗІЮМЭ**Гуляева Юлія Васільеўна****Малекулярная дыягностыка спадчыннага непаліпознага каларэктальнага рака ў жыхароў Рэспублікі Беларусь**

Ключавыя словы: рак тоўстай кішкі, сіндром Лінча, першасна-множная злаякасная хвароба, мікрасатэлітная нестабільнасць, малекулярныя парушэнні ў генах сістэмы рэпарацыі ДНК.

Мэта даследавання: павысіць эфектыўнасць дыягностыкі спадчыннага непаліпознага каларэктальнага рака у пацыентаў з ракам тоўстай кішкі з ліку жыхароў Рэспублікі Беларусь.

Матэрыял і метады даследавання: Работа заснавана на рэтраспектыўным аналізе дадзеных гісторый хваробы 584 першасных пацыентаў з ракам тоўстай кішкі. Матэрыялам паслужылі тканіна пухліны і перыферычная кроў пацыентаў, уключаных у даследаванне, згодна адпаведнасці Амстэрдамскім крытэрыям. У рабоце выкарыстаны сучасныя метады малекулярнай дыягностыкі. Статыстычны аналіз выкананы з выкарыстаннем камп'ютэрных пакетаў SPSS (версія 17.0.0, ЗША), Excel 2009 («Microsoft Office»). Пры ўсіх відах статыстычнага аналізу адрозненні лічылі статыстычна значнымі пры узроўні значнасці $p < 0,05$.

Атрыманя вынікі і іх навізна. Упершыню вызначана панэль мікрасатэлітных маркераў, якая ўключае локусы генаў Bat-26, (hMSH2), D2S12 (hMSH2) і D5S346 (APC), і валодае 100% дыягнастычнай адчувальнасцю і спецыфічнасцю для дыягностыкі спадчыннага непаліпознага каларэктальнага рака ў пацыентаў з ліку жыхароў Рэспублікі Беларусь. Вызначана частата мікрасатэлітнай нестабільнасці ў аденакарцыноме тоўстай кішкі з спадчынным характарам захворвання ў пацыентаў пры першасна-множных формах злаякаснай хваробы. Вызначаны малекулярна-генэтычныя фактары, якія ўключаюць раней не апісаныя ў літаратуры, прыводзяць да змены функцыянальнай актыўнасці бялкоў – MLH1 (с. 688 K>stop), MSH6 (с. 399 L>stop), MSH6 (с. 557 S> stop), MLH1 (с. 219 I>V) (RS 1799977), MLH1 (с. 43A>E), MLH1 (с. 205 V>G), MLH1 (с. 642 P>L) і аказваюць уплыў на рызык развіцця спадчыннага непаліпознага каларэктальнага рака у пацыентаў і прабандаў. Распрацаваны комплекс мерапрыемстваў для дыягностыкі спадчыннага непаліпознага каларэктальнага рака, які дазваляе вылучыць групу высокага рызыку развіцця спадчыннага непаліпознага каларэктальнага рака ў прабандаў з ліку жыхароў Рэспублікі Беларусь.

Ступень выкарыстання: матэрыялы дысертацыйнай працы выкарыстоўваюцца ў РНПЦ АМР ім. М.М. Аляксандрава.

Вобласць выкарыстання: анкалогія, генэтыка, практалогія.

РЕЗЮМЕ

Гуляева Юлия Васильевна

Молекулярная диагностика наследственного неполипозного колоректального рака у жителей Республики Беларусь

Ключевые слова: рак толстой кишки, синдром Линча, первично-множественное злокачественное поражение, микросателлитная нестабильность, молекулярные нарушения в генах системы репарации ДНК.

Цель исследования: повысить эффективность диагностики наследственного неполипозного колоректального рака у пациентов, страдающих колоректальным раком, из числа жителей Республики Беларусь.

Материал и методы исследования: Работа основана на ретроспективном анализе данных историй болезни 584 первичных пациентов, страдающих колоректальным раком. Материалом послужили опухолевая ткань и периферическая кровь пациентов, включенных в исследование, согласно соответствию Амстердамским критериям. В работе использованы современные методы молекулярной диагностики. Статистический анализ выполнен с использованием компьютерных пакетов SPSS (версия 17.0.0, США), Excel 2009 («Microsoft Office»). При всех видах статистического анализа различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Полученные результаты и их новизна. Впервые определена панель микросателлитных маркеров, включающая локусы генов *Bat-26*, (*hMSH2*), *D2S12(hMSH2)* и *D5S346 (APC)*, обладающая 100% диагностической чувствительностью и специфичностью, для диагностики наследственного неполипозного колоректального рака у пациентов, страдающих колоректальным раком, из числа жителей Республики Беларусь. Определена частота микросателлитной нестабильности в аденокарциноме толстой кишки у пациентов при первично-множественных формах злокачественных новообразований. Определены молекулярно-генетические факторы, включающие ранее не описанные в литературе, которые приводят к изменению функциональной активности белков – *MLH1* (с. 688 K>stop), *MSH6* (с. 399 L>stop), *MSH6* (с. 557 S>stop), *MLH1* (с. 219 I>V) (RS 1799977), *MLH1* (с. 43A>E), *MLH1* (с. 205 V>G), *MLH1* (с. 642 P>L) и оказывающие влияние на риск развития наследственного неполипозного колоректального рака у пациентов и пробандов. Разработан комплекс мероприятий для диагностики наследственного неполипозного колоректального рака, позволяющий выделить группу высокого риска развития ННКРР у пробандов из числа жителей Республики Беларусь.

Степень использования: материалы диссертационной работы используются в РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова.

Область применения: онкология, генетика, проктология.

Abstract

Gulyaeva Yuliya Vasijevna

Molecular diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer among residents of the Republic of Belarus

Key words: colon cancer, Lynch syndrome, primary multiple malignant disease, microsatellite instability, molecular mutations in the genes of the DNA repair system.

Purpose: increase the diagnostic efficiency of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in patients with colorectal cancer, among the residents of the Republic of Belarus.

Material and methods: The study is based on a retrospective analysis of data from 584 case histories of patients with primary colorectal cancer. Material are the tumor tissue and peripheral blood of patients included in the study, according to the relevant criteria of Amsterdam. We used modern methods of molecular diagnostics. Statistical analysis was performed using the computer package SPSS (version 17.0.0, USA), Excel 2009 («Microsoft Office»). For all types of statistical analysis of the differences were considered statistically significant for level $p < 0.05$.

Results and innovation: for the first time the microsatellite markers panel is defined, which includes Bat-26 (hMSH2), D2S12 (hMSH2) and D5S346 (APC) which has 100% diagnostic sensitivity and specificity for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in patients with colorectal cancer, from among the residents of the Republic of Belarus. The frequency of microsatellite instability has defined in adenocarcinoma of the colon with the hereditary nature of the disease in patients with primary multiple forms of malignancies. The molecular-genetic factors has defined, including not previously described in the literature, which lead to changes in functional activity of proteins MLH1 (s. 688>stop), MSH6 (c. 399>stop), MSH6 (c. 557S>stop), MLH1 (c. 219 I>V) (RS 1799977), MLH1 (c. 43A>E), MLH1 (c. 205 V>G), MLH1 (c. 642 R>L) and influencing the risk of HNPCC for patients and probands. We study the molecular factors and determine their importance in predicting the development of the individual hereditary forms of colorectal cancer residents of Belarus, allowing to identify high risk of tumor development. The set of measures for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer, which allows to select a group of high risk for development of hereditary nonpolyposis colorectal cancer for probands from among the residents of the Republic of Belarus.

Implementation degree: the materials of the thesis are being used at N.N. Alexandrov National Cancer Centre.

Area of use: oncology, genetics, proctology.