

УДК 616.345-056.7-07:616-006.5-031.81:575.224.2

ЗВ'ЯЗОК ГЕНОТИПУ І ФЕНОТИПУ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ СИНДРОМОМ ГАРДНЕРА

М.Р. ЛОЗИНСЬКА¹, А. ПЛАВСЬКИЙ², Ю.С. ЛОЗИНСЬКИЙ³¹ ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»

Україна, 79000, Львів, вул. М. Лисенка, 31-а

² Інститут генетики людини Польської академії наук

Польща, 60-479, Познань, вул. Стшешинська, 32

³ Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Україна, 79000, Львів, вул. М. Лисенка, 31-а

e-mail:maria_lozynska@ukr.net

Мета. Дослідити взаємозв'язок спектра мутацій гена APC і фенотипу пацієнтів із синдромом Гарднера. **Методи.** Клінічне обстеження, генеалогічний аналіз і молекулярно-генетичне дослідження пробандів та осіб групи ризику. **Результати.** Мутації гена APC було підтверджено у всіх пацієнтів із синдромом Гарднера. У трьох сім'ях виявлено мутації, зумовлені делеціями нуклеотидів. Середній вік маніфестації симптомів хвороби становив 29 років. Найбільшу кількість хворих на рак товстої кишки було виявлено серед носіїв мутації, зумовленої делецією одного нуклеотида. **Висновки.** Проведення ДНК-діагностики у пацієнтів із синдромом Гарднера є необхідним методом для прогнозування перебігу захворювання та виявлення осіб групи ризику.

Ключові слова: синдром Гарднера, генеалогічний аналіз, мутації гена APC, позакишкові симптоми хвороби.

Вступ. У 1951 році Гарднер (Gardner) описав рідкісний варіант сімейного аденоматозного поліпозу (САП) з автосомно-домінантним типом успадкування і практично повною пенетрантністю, з позакишковими симптомами (ПКС) хвороби, серед яких найрозповсюдженіші природжені вади розвитку (ПВР). Згідно з літературними повідомленнями популяційна частота синдрому Гарднера (СГ) становить 1:15 000 серед живонароджених [1, 2]. Приблизно у 80% пацієнтів із СГ виявлено мутації гена APC, який міститься на довгих плечах 5 хромосоми (5q21) і містить 15 екзонів. На сьогодні відомо більше 800 мутацій гена APC. У нормі ген кодує білок – супресор пухлинного росту, що відіграє важливу роль у Wnt-сигнальному шляху. Продукти цього гена опосередковано регулюють транскрипцію великої кількості важливих генів клітинної проліферації через їхню взаємодію з транскрипційним фактором β-катеніну [1, 3]. Мутації гена APC призводять до порушення міграції епітеліальних клітин [4]. Більшість мутацій гена APC представлена делеціями, вставками, беззмистовними мутаціями, що призводять до вкорочення білків. Велика різноманітність і низька повторюваність мутацій гена APC ускладнює аналіз їхнього походження. Наприклад, із 38 найдених мутацій тільки 6 мутацій повторювалось у 2–4 сім'ях [1]. Перші ознаки СГ найчастіше маніфестують у період статевого дозрівання. До них належать диспепсія з частими рідкими дефекаціями, біль у животі, анемія, порушення обмінних процесів, що в майбутньому призводить до затримки фі-

© М.Р. ЛОЗИНСЬКА, А. ПЛАВСЬКИЙ, Ю.С. ЛОЗИНСЬКИЙ, 2013

зичного розвитку [3]. Серед найрозповсюдженіших ПВР при СГ є аномалії лицевої частини черепа (зубів, щелеп, піднебіння), природжена гіпертрофія пігментного епітелію сітківки (ПГПЕС). Хоча у переважній більшості пацієнтів ПГПЕС є безсимптомною вадою, описані рідкісні випадки виникнення аденокарцином епітелію сітківки [5]. Середній вік пацієнтів, яким ставлять діагноз СГ, становить приблизно 28 років [6, 7]. Частими ПКС СГ є пухлини м'яких тканин (десмоїдні пухлини, фіброми, ліпоми, епідермальні кисти), які рідко малігнізуються. Для цього синдрому характерними є також множинні остеоми та пухлини кісток. Всі ці процеси свідчать про своєрідні зміни мезенхімальної тканини [1, 6]. Синдром характеризується онкологічними ускладненнями, найчастіше раком товстої кишки (РТК) та іншими злоякісними новоутвореннями позакишкової локалізації (рак щитоподібної, підшлункової, молочної залози, рак шлунка, гепатобластома, дуоденальний рак), частота яких у сотні разів перевищує загальнопопуляційний рівень [8, 9]. Метою роботи було дослідити спектр мутацій гена *APC* у пацієнтів – мешканців західних областей України із СГ з різними ПКС та онкологічними захворюваннями.

Матеріали та методи

Протягом 2008–2013 років було проведено аналіз медичних карт, клінічне та молекулярно-генетичне обстеження 4 сімей пробандів із СГ. ДНК-діагностику проведено для 4 пробандів та 3 їх близьких родичів. Пацієнти були мешканцями Львівської області. Для встановлення діагнозу використовували загальноклінічний, ендоскопічний, променеви та лабораторний методи дослідження. З метою встановлення типу успадкування захворювання застосовували генеалогічний аналіз сімей пробандів у 3–4 поколіннях. Перед забором крові для молекулярно-генетичних досліджень від кожного пацієнта було отримано інформо-

вану згоду на виконання цього аналізу. Для визначення мутацій гена *APC* використовували полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), скринінгові методи пошуку невідомих точкових мутацій. Для отримання характеристики мутацій проводили секвенування продуктів ПЛР. Геномну ДНК виділяли з периферійної крові, використовуючи метод висолування. Застосували праймери, що включали індивідуальні екзонсплайсингові сайти [10]. Ампліфіковані фрагменти гена *APC* перевіряли на наявність мутацій із використанням гетеродуплексного аналізу (HD) та аналізу конформаційного поліморфізму одниткової ДНК (SSCP). Фрагменти ДНК, що формували гетеродуплекс під час проведення HD аналізу чи відмінні варіанти SSCP, підлягали прямому секвенуванню продукту ПЛР із застосуванням секвенатора ABI 3700 згідно з інструкцією виробника. Для виконання MLPA (мультилокусної лігазної пробозалежної ампліфікації) використовували набори SALSA MLPA KIT PO43APC (MCR, Голландія, Амстердам). Аналіз було виконано згідно з інструкцією виробника (<http://www.mrc-holland.com>).

Результати та обговорення

Протягом 2004–2013 років провели аналіз медичних карт, клінічне та молекулярно-генетичне обстеження 24 пробандів із множинним аденоматозним поліпозом з кількістю поліпів у товстій кишці, наближеною до 100 чи більше. У 4 пробандів було підтверджено СГ. Середній вік маніфестації захворювання становив 29 (15–43) років. Результати дослідження спектра мутацій у пробандів із СГ та у їхніх близьких родичів наведено в таблиці.

Мутації гена *APC* підтверджено у всіх пробандів із СГ. Мутації, зумовлені делеціями нуклеотидів, виявлено у 3 сім'ях із СГ, замінами – у 1 сім'ї. РТК діагностовано у 3 сім'ях. Найбільшу кількість хворих на РТК серед носіїв мутації гена *APC* виявлено у сім'ї 1 (таблиця).

Таблиця. Спектр мутацій гена APC у сім'ях із синдромом Гарднера, ускладненим і не ускладненим колоректальним раком

№ сімей пробандів із СГ	Родинний статус пацієнтів	Спектр мутацій/(кількість осіб з обстежених сімей, яким провели ДНК-діагностику)	Кількість хворих на СГ у сім'ї	Кількість хворих на РТК у межах сім'ї
1	Пробанд (САС) 2 особи ГР	Мутація гена APC: с.3343delA p.R1114fs/(3)	7	5
2	Пробанд (СТМ) 1 особа ГР	Мутація гена APC: с.3927_3931delAAAGA p.Q1309fs (codon 1309, exon 15)/(2)	3	0
3	Пробанд (ТНЯ)	Мутація гена APC: делеція екзонів 11,12,13,14/(1)	3	1
4	Пробанд (ЮГМ)	Мутація гена APC: с.532-1G>A(exon 5) мутація сайту сплайсинга/(1)	2	1
Разом	ПР (4) ГР (3)	3 делеції, 1 заміна / 7 осіб	15	7

Примітка: ПР – пробанди, ГР – група ризику.

У сім'ї 1 успадкування варіанту САП – СГ спостерігали у 7 осіб із 4 поколінь (рис. 1).

У пробанда, чоловіка віком 36 років, та його рідного брата виявлено ПКС хвороби: ПВР піднебіння, щелеп та аномалії розвитку зубів, ПГПЕС. У цих хворих також діагностовано пухлинні захворювання кісток

(остеоми), м'яких пухлин (фіброми, десмоїдні пухлини) та поліпи шлунка. Десмоїдні пухлини – важкі прояви СГ. Встановлення факторів ризику може бути корисним у веденні пацієнтів із такими пухлинами. За даними літератури, частота виявлення десмоїдних пухлин у пацієнтів із СГ становить 5,0–9,0%, а кумулятивний

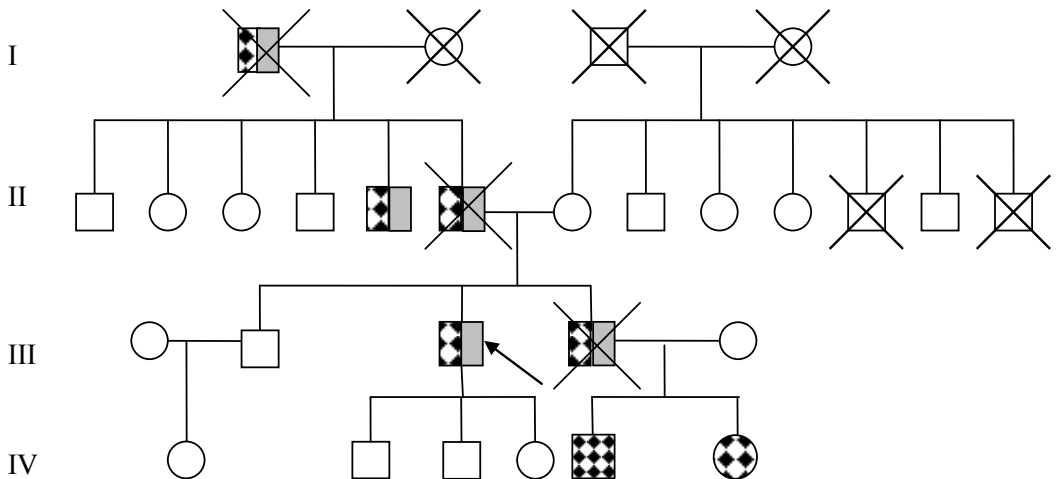


Рис. 1. Родовід сім'ї 1 пробанда (САС) із синдромом Гарднера, раком товстої кишки із маркерною мутацією гена APC с.3343delA p.R1114fs: ■ – СГ; ■ – РТК

ризик розвитку цих пухлин – 14,0%. Пацієнти з позитивним сімейним анамнезом пухлин мають статистично достовірний ризик їхнього розвитку (30,0% порівняно з 6,7%, $P < 0,001$) [11]. У пробанда у віці 35 років виявлено первинно-множинний РТК із локалізацією у сигмоподібній, поперечно-ободовій та сліпій кишці. Рідний брат пробанда звернувся по консультацію у віці 43 роки з явищами часткової кишкової непрохідності у зв'язку з аденокарциномою сигмоподібної кишки, яка виникла на фоні СГ, та інтрамедулярним раком печінки. Пацієнт помер. Двоє дітей брата пробанда віком 19 та 20 років звернулися в Міжобласний медико-генетичний центр м. Львова у зв'язку зі СГ у сім'ї. У сина було виявлено, як і у батька і дядька, аномалії лицевої частини черепа та множинні пухлини на різних ділянках тіла. У дочки пробанда ПВР не було. Серед ПКС у неї домінували пухлини м'яких тканин різної локалізації, які з'явилися у віці 14 років. У дівчини протягом тривалого часу констатовано підвищений рівень білірубіну (від 33,81 до 42,25 мкМ-л). У пацієнтів – членів цієї сім'ї – було ідентифіковано маркерну мутацію гена APC, зумовлену делецією одного нуклеотида, що призвела до зміни рамки зчитування (див. табл.).

У сім'ї 2 із СГ (див. табл.), яка налічувала 3-х уражених осіб, пробандом була дівчинка 15 років, у якої поряд із поліпозом товстої кишки було виявлено аномалії зубів, арахнодактилію і гіперрухливість суглобів. У неї встановлено мутацію гена APC в кодні 1309, зумовлену делецією 5 нуклеотидів, що призводить до зміни рамки зчитування генетичного коду і синтезу беззмстовного вкороченого чужорідного білка. На рис. 2 наведено родовід цієї сім'ї.

У батька пробанда, який трагічно помер у віці 43 років, попередньо діагностували поліпоз шлунка, товстої кишки, а також аномалії зубів. За даними літератури, мутації 1309del5 становлять третину мутацій гена APC. В Європі частота цієї мутації – 8–20% від всіх мутацій гена APC, у Сингапурі – 36%, а в Іспанії і Португалії її не виявлено [12, 13]. Ці дані свідчать про нерівномірний розподіл мутації 1309del5 за різними популяціями. Ця мутація хоча і має внутрішньо- і міжсімейну варіабельність, однак згідно з літературними повідомленнями в більшості випадків призводить до раннього початку захворювання, супроводжується сотнями поліпів у молодому віці і раннім виникненням РТК [12, 14]. Цікаво, що сестру пробанда було направлено на ДНК-діагностику у віці 13 років на основі

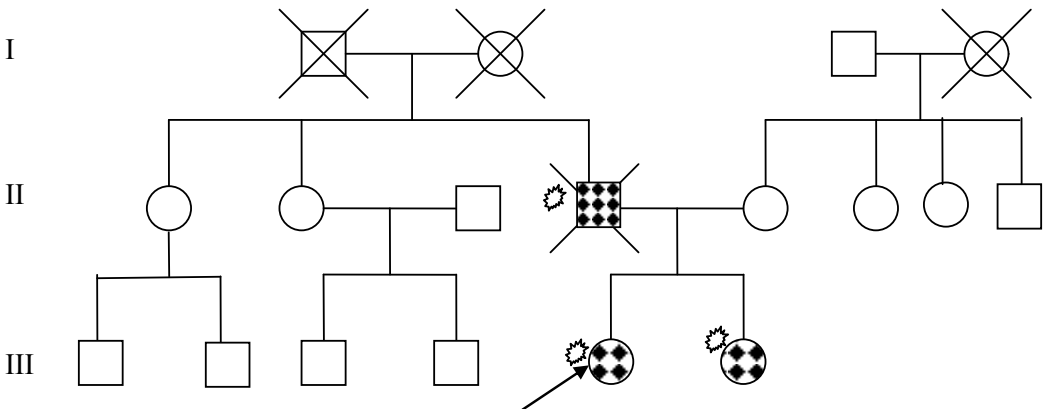


Рис. 2. Родовід сім'ї 2 пробанда (СТМ) з синдромом Гарднера і маркерною мутацією гена APC (кодні 1309, екзон 15): с.3927_3931delAAAGA p.Q1309fs: ☠ – СГ; ☠ – аномалії зубів

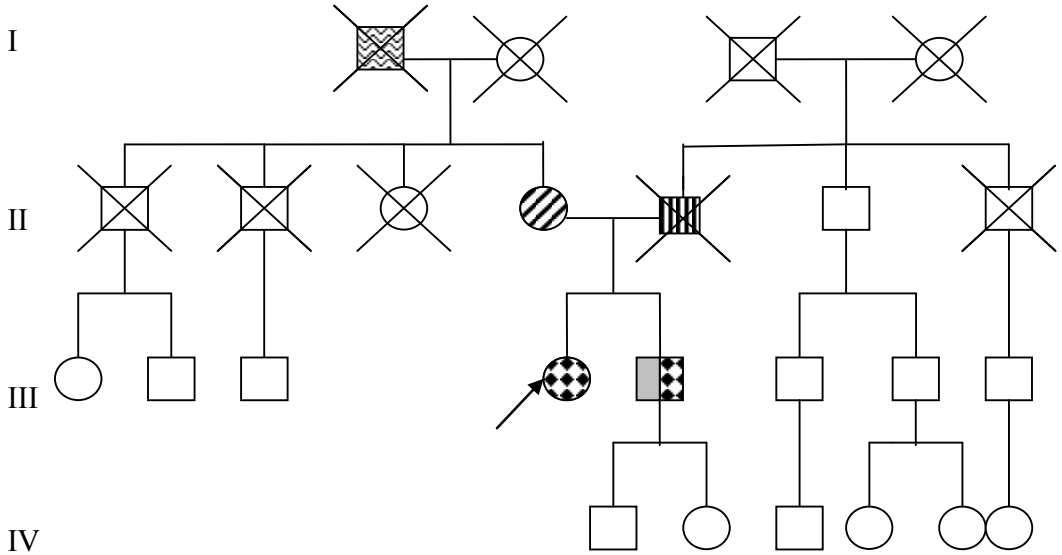


Рис. 3. Родовід сім'ї 3 пробанда (ТНЯ) із синдромом Гарднера і мутацією гену *APC*, що зумовлена делецією екзонів 11, 12, 13, 14: ▨ – СГ; ▩ – РТК; ▮ – рак підшлункової залози; ▧ – рак легень; ⊘ – гастрит

наявності характерних для СГ ПВР аномалій зубів та опорно-рухового апарату, що успадкувалися по лінії батька, і підтверджено маркерну мутацію ще до проявів кишкових симптомів захворювання.

На рис. 3 наведено родовід сім'ї 3 пробанда (ТНЯ) із СГ та з випадками РТК і раку підшлункової залози, у якій було виявлено делецію гену *APC* за допомогою нового методу MLPA, що дозволив дослідити делецію великого розміру, недоступну для встановлення традиційним способом [15].

У пробанда-жінки у віці 26 років виявлено множинні поліпи тубулярної і тубулярно-папілярної будови за ходом всієї товстої кишки. В лівих відділах кишки кількість поліпів різного ступеня дисплазії (від I до III) перевищувала 100, однак у сліпій і висхідній кишці виявили лише 5 поліпів. У пацієнтки діагностовано ПКС, характерні для СГ: фіброму на голові і правій нозі та аномалію прикусу. У брата пробанда у віці 28 років було діагностовано метастатичний РТК на основі множинного поліпозу товстої

кишки, а батько помер від раку підшлункової залози у віці 47 років. У батька теж були ПКС – фіброма на голові та аномалія прикусу.

Носієм мутації гену *APC* у сайті сплайсингу виявилась жінка-пробанд (ЮГМ) сім'ї 4 з ранньою маніфестацією СГ у 28 років (див. табл.). Пацієнтка мала ПКС: остеому на нижній щелепі та фіброму на нозі. Батько пробанда помер від РТК на основі множинного поліпозу товстої кишки у віці 48 років. Зі слів пацієнтки, інші родичі батька не хворіли на РТК. Родовід пробанда (ЮГМ) наведено на рис. 4.

Двоє дітей, 3 сибсів та 5 племінників пробанда є групою ризику виникнення СГ і РТК. Всі особи групи ризику потребують консультації генетика і проведення ДНК-діагностики.

Механізми виникнення скелетної патології при СГ стали зрозумілими в останні роки. Було доведено значення білкового продукту *APC* як основного регулятора рівня β-катеніну. На сьогодні підтверджено

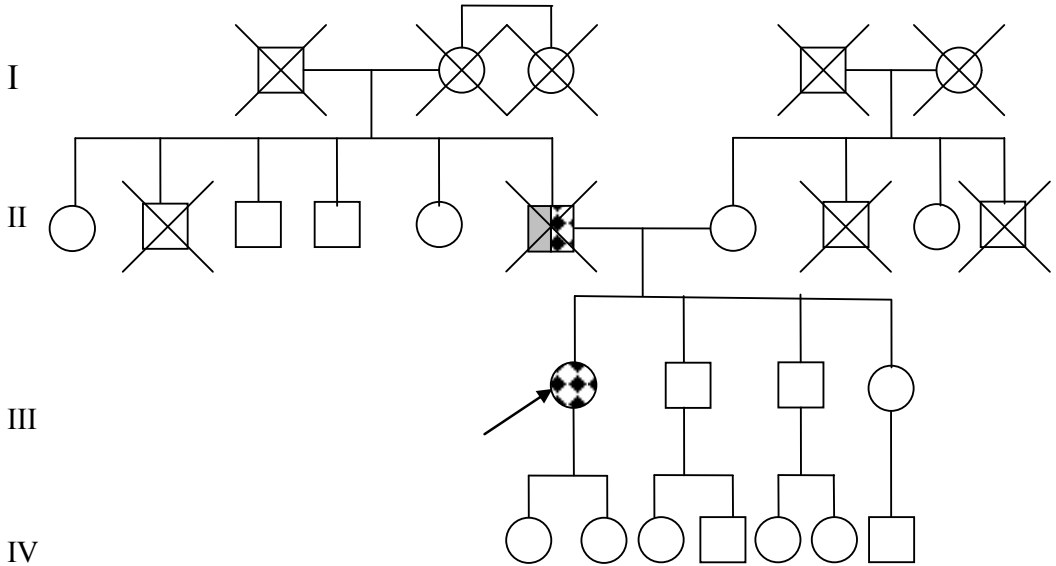


Рис. 4. Родовід сім'ї 7 пробанда (ЮГМ) із синдромом Гарднера і мутацією гена *APC* с.532-1G>A(ехон 5): – СГ; – РТК

значення β -катеніну в регуляції кісткової маси і патофізіології численних скелетних аномалій та виникненні пухлин кісток [16, 17]. Інактивація гена *APC* призводить до остеосклеротичного кісткового фенотипу. Вчені припускають, що СГ може бути моделлю для розуміння *Wnt*/ β -катенінового сигнального шляху в формуванні кісткової маси і її збереженні у людини [16, 18].

Відомо, що конституційні мутації в протоонкогенах і генах – супресорах пухлин можуть спричиняти ПВР. За виникнення спадкових новоутворень товстої кишки відповідають у більшості випадків гени – супресори пухлин. Багато продуктів цих генів відіграють важливу роль у сигнальних шляхах, відповідають за клітинну проліферацію чи виконують одночасно ці дві функції. І навпаки: багато випадків спадкової схильності до неоплазій не пов'язані з ПВР, незважаючи на експресію генів під час ембріогенезу. Прикладом може бути схильність до ракових синдромів, зумовлених мутаціями генів *BRCA*, *MLM*, *TP53* [19].

Висновки

В обстеженій групі пацієнтів із синдромом Гарднера встановлено мутації гена *APC*. Найбільшу кількість хворих на РТК виявлено в сім'ї пробанда, «позитивного» за мутацією, зумовлену делецією одного нуклеотиду (с.3343delA р.Р1114fs). Найбільш ранній початок захворювання діагностовано у пробанда з мутацією в кодони 1309, зумовлену делецією 5 нуклеотидів.

У групі пацієнтів із синдромом Гарднера виявлено широкий спектр ПКС, які були додатковими маркерами захворювання у пробандів та в групі ризику. Найчастіші ПКС – аномалії лицевої частини черепа і пухлини м'яких тканин – було діагностовано у пацієнтів із делеціями гена *APC* різного розміру і мутацією в сайті сплайсингу.

Проведення ДНК-діагностики у пацієнтів із множинним аденоматозним поліпозом є необхідним методом для прогнозування перебігу захворювання та виявлення осіб групи ризику.

Перелік літератури

1. Half E., Bercovich D., Rosen P. Familial adenomatous polyposis // Orphanet Journal of Rare Diseases. – 2009. – Vol. 4. – P. 4–22.
2. Basaran G., Erkan M. One of the rarest syndromes in dentistry: Gardner syndrome // Eur. J. Dent. – 2008. – P. 20 8–212.
3. Delaini G.G., Skříčka T., Colucci G. Intestinal polyps and polyposis. From genetics to treatment and follow up. – Italia: Springer-Verlag, 2009. – 243 p.
4. Kaz A.M., Brentnall T.A. Genetic testing for colon cancer // Natural Clinical Practice Gastroenterology et Hepatology. – 2006. – Vol. 3, № 12. – P. 125–134.
5. Shields J.A., Shields C.L., Eagle R.C., Singh A.G. Adenocarcinoma arising from congenital hypertrophy of retinal pigment epithelium // Arch Ophthalmol. – 2001. – Vol. 119. – P. 597–602.
6. Fotiadis D.K., Tsekouras P., Antonakis J. et al. Gardner's syndrome: A case report and review of the literature // World J. Gastroenterol. – 2005. – Vol. 11, № 34. – P. 5408–5411.
7. Chimenos-Küstner E., Pascual M., Blanco I., Finestres F. Hereditary familial polyposis and Gardner's syndrome: Contribution of the odontostomatology examination in its diagnosis and a case description // Med. Oral Patol. Cir. Buca. – 2005. – Vol. 10. – P. 402–409.
8. Groen I.J., Roos A., Muntinghe F.L. et al. Extra-intestinal manifestations of familial adenomatous polyposis // Ann Surg Oncol. – 2008. – Vol. 15. – P. 2439–2450.
9. Groves C.J., Saunders B.P., Spigelman A.G., Fillips R.K. Duodenal cancers in patients with adenomatous polyposis (FAP): results of a 10 year prospective study // Gut. – 2002. – Vol. 50. – P. 636–641.
10. Miyoshi Y., Ando H., Nagase H. et al. Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1992. – Vol. 89. – P. 4452–4456.
11. Nieuwenhuis M.H. Desmoid tumors in Dutch cohort of patients with familial adenomatous polyposis // Clin. Gastroenterol. Hepatol. – 2008. – Vol. 6, № 2. – P. 215–219.
12. Plawski A., Slomski R. APC gene mutations causing familial adenomatous polyposis in Polish patients // J. Appl. Genet. – 2008. – Vol. 49, № 4. – P. 407–414.
13. Ruiz-Ponte C., Vega A., Carracedo A., Barros F. Mutation analysis of adenomatous polyposis coli (APC) gene in northwest Spanish patients with familial adenomatous polyposis (FAP) and sporadic colorectal cancer // Hum. Mutat. – 2001. – Vol. 18. – P. 355.
14. Муффазарова Т.А., Поспехов Н.И., Карпухин А.В. Новые мутации в гене APC // Бюлл. эксп. биол. – 2005. – Т. 139. – С.334–336.
15. Renconen E.T., Nieminen P., Abdel-Rahman W.M. et al. Adenomatous polyposis families that screen APC mutation-negative by conventional methods are genetically heterogenous // Clin Oncol. – 2005. – Vol. 23. – P. 5651–5659.
16. Masci C.E., Foster B.K., Xian C.J. Role of Wnt-signaling in bone growth, remodeling skeletal disorders and fracture repair // J. Cell Physiol. – 2008. – Vol. 215, № 3. – P. 578–87.
17. Miclea R.L., Karperien M., Langers A.M. APC mutations are associated with increased bone mineral density in patients with familial adenomatous polyposis // J. Bone Miner. Res. – 2010. – Vol. 25, № 12. – P. 2348–56.
18. Wijn M.A., Keller J.J., Giardiello F.M., Brand H.S. Oral and maxillofacial manifestations of familial adenomatous polyposis // Oral Dis. – 2007. – Vol. 13, № 4. – P. 360–365.
19. Friedman J.M. Genetics and epidemiology. Congenital abnormalities and cancer // Am. J. Hum. Genet. – 1997. – Vol. 60. – P. 469–473.

Представлено Л.Л. Лукаш

Надійшла 27.05.2013

СВЯЗЬ ГЕНОТИПА И ФЕНОТИПА У ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ГАРДНЕРА

М.Р. Лозинская¹, А. Плавский², Ю.С. Лозинский³

¹ГУ «Институт наследственной патологии НАМН Украины»

Украина, 79000, Львов, ул. М. Лысенка, 31-а

²Институт генетики человека Польской академии наук

Польша, 60-479, Познань, ул. Стшешиньска, 32

³Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого

Украина, 79000, Львов, ул. М. Лысенка, 31-а

e-mail: maria_lozynska@ukr.net

Цель. Исследовать взаимосвязь спектра мутаций гена APC и фенотипа пациентов с синдромом Гарднера. **Методы.** Клиническое обследование, генеалогический анализ и молекулярно-генетическое исследование пробандов и группы риска. **Результаты.** Мутации гена APC были подтверждены у всех пробандов с синдромом Гарднера. В трех семьях выявлены мутации, обусловленные делециями нуклеотидов. Средний возраст манифестации симптомов болезни составлял 29 лет. Самое боль-

шое количество больных раком толстой кишки было выявлено среди носителей мутации гена *APC*, обусловленной делецией одного нуклеотида. **Выводы.** Проведение ДНК-диагностики у пациентов с синдромом Гарднера является необходимым методом для прогнозирования течения заболевания и выявления особой группы риска.

Ключевые слова: синдром Гарднера, генеалогический анализ, мутации гена *APC*, внекишечные симптомы болезни.

CORRELATION BETWEEN GENOTYPE AND PHENOTYPE IN PATIENTS WITH GARDNER SYNDROME

M.R. Lozynska¹, A. Plawski², Y.S. Lozynsky³

¹ Institute of Hereditary Pathology of NAMS of Ukraine

Ukraine, 79000, Lviv, M. Lysenka str., 31-a

² Institute of Human Genetics of Polish Academy of Sciences

Poland, 60-479, Poznań, Strzeszyńska str., 32

³ Lviv National medical university from Danylo

Halytskyy

Ukraine, 79000, Lviv, M. Lysenka str., 31-a

e-mail: maria_lozynska@ ukr.net

Aim. Aim is to investigate the relationship of *APC* gene mutation spectrum and phenotype in patients with Gardner syndrome. **Methods.** Clinical examination, genealogical analysis and molecular genetic study of probands and those at risk. **Results.** The mutations of *APC* gene was confirmed in all patients with Gardner syndrome. In three families were identified mutations due to deletions of nucleotides. The average age of symptoms manifestation was 29 years. The largest number of patients with colon cancer was found among carriers of mutations due to deletion of one nucleotide. **Conclusion.** Conducting DNA diagnosis in patients with Gardner syndrome is a necessary method for the prediction of disease and identifying individuals at risk.

Key words: Gardner syndrome, genealogical analysis, mutations of *APC* gene, extraintestinal manifestation.