

DOI: <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2022.6.38>

Ассоциации генетических вариантов генов и вирусной ДНК/РНК при раке печени и толстого кишечника

О.Е. Кузнецов¹, В.М. Цыркунов²

¹Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, г. Гродно, Республика Беларусь

²Гродненский государственный медицинский университет, г. Гродно, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2022. – Том 21, №6. – С. 38-46.

Associations of genetic variants of genes and viral DNA/RNA in liver and colon cancer

A.E. Kuzniatsou¹, V.M. Tsyrukunov²

¹Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus

²Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2022;21(6):38-46.

Резюме.

Цель – установить ассоциации генетических вариантов генов и вирусной ДНК/РНК при раке печени и раке толстого кишечника (РТК).

Материал и методы. Материал для исследования: образцы ткани и крови лиц с морфологически установленным диагнозом РТК и РП (n=130). Возраст обследуемых – 61,8±13,7 года. Выполнено молекулярно-биологическое исследование обнаружения ДНК/РНК генома вирусов и исследование генов BRCA1/2 и hMSH2. Контрольная группа – образцы крови 80 здоровых лиц с отсутствием новообразования и инфекций. Статистическая обработка – пакет программ SPSS. Результаты. Количество мутаций генов BRCA1/2 и hMSH2 в образцах крови у лиц с РТК составило 2,04%, при частоте изменений в гене hMSH2 – 4,17%, что ниже частоты детектируемых мутаций в этих же генах в образцах опухолевой ткани (p=0,003). Частота мутаций в генах BRCA1 и hMSH2 в популяции – 1,25%. Мутации генов BRCA 1/2 у женщин показали их зависимость при РТК с геном hMSH2 (p<0,05). Количество мутаций при РП составило 6,13% для образцов тканей и 0,85% для крови (p=0,004). Удельный вес носительства вирусной ДНК/РНК при РП – 9,1%, при РТК – 6,6%.

Заключение. Мутации гена BRCA1/2 и hMSH2 у лиц с РТК в крови и в образцах тканей позволяют предположить наследственную природу опухоли. Наличие мутаций в генах BRCA 1/2 у женщин следует рассматривать как риск развития РТК: встречаемость при РП коррелирует с изменениями в экзонах 6 и 12 гена hMSH2. Наличие мутаций гена hMSH2 (экзон 6, 12) при РП в группе 61,4±3,4 года и 61,7±3,07 года, следует рассматривать как риск развития РП. Ассоциации мутаций генов с вирусами позволяют заключить, что высокий онкогенный потенциал несут ВПЧ, ЦМВ, ВГП 1/2, HHV6, HBV и HCV.

Ключевые слова: рак печени, рак толстого кишечника, вирусы, мутации.

Abstract.

Objectives. To establish the associations of genetic variants of genes and viral DNA/RNA in liver cancer (LC) and colorectal cancer (CRC).

Material and methods. Tissue and blood samples of individuals with morphologically diagnosed CRC and LC (n=130) served as the material for the study. The age of the examined persons was 61.8±13.7 years. A molecular biological study of the detection of DNA/RNA of the virus genome and a study of the BRCA1/2 and hMSH2 genes were performed. The control group was represented by blood samples of 80 healthy individuals with no neoplasms and infections. Statistical processing – SPSS software package.

Results. The number of mutations in the BRCA1/2 and hMSH2 genes in blood samples from patients with CRC was 2.04%, while the frequency of changes in the hMSH2 gene was 4.17%, which is lower than that of detected mutations in the same genes in tumor tissue samples ($p=0.003$). The frequency of mutations in the BRCA1 and hMSH2 genes in the population was 1.25%. Mutations of the BRCA 1/2 genes in women showed their dependence on the hMSH2 gene ($p<0.05$) in CRC. The number of mutations in LC made up 6.13% for tissue samples and 0.85% for the blood ($p=0.004$). The share of viral DNA/RNA carriage in LC was 9.1%, in CRC it made up 6.6%.

Conclusions. Mutations in the BRCA1/2 and hMSH2 genes in individuals with CRC in the blood and tissue samples enable us to suggest a hereditary nature of the tumor. The presence of mutations in the BRCA 1/2 genes in women should be considered as a risk factor of developing CRC: the occurrence in LC correlates with changes in exons 6 and 12 of the hMSH2 gene. The presence of mutations in the hMSH2 gene (exon 6, 12) in LC in the group of patients aged 61.4 ± 3.4 years and 61.7 ± 3.07 years should be considered as a risk factor of developing LC. Associations of gene mutations with viruses allow us to conclude that HPV, CMV, HSV 1/2, HHV6, HBV and HCV have a high oncogenic potential.

Keywords: liver cancer, colon cancer, viruses, mutations.

Введение

В структуре онкологической заболеваемости рак толстого кишечника (РТК) и рак печени (РП) занимают одно из ведущих мест. Наша страна входит в группу стран с невысокими уровнями онкозаболеваемости, но за последнее десятилетие заболеваемость РТК увеличилась в три раза, а около 35% случаев РП диагностируется на III и IV стадиях [1-3].

До недавнего времени единственной наследственной формой считался колоректальный рак (КРР), составляющий 1-3% всех опухолей толстого кишечника (ТК). К развитию КРР приводят герминальные мутации в генах, у носителей которых риск развития рака составляет 70-84%. Однако в значительном количестве семейных случаев не имеется мутаций в «критичных» генах, что позволяет предположить существование герминальных мутаций в других генах. Сегодня уже известно несколько наследственных синдромов с предрасположенностью к опухолям, которые дополняют уже известные наследственные формы: синдромы Линча, Ли-Фраумени, Пейтца-Егерса и другие [4-9].

Основные методы определения молекулярно-биологических маркеров в онкологии основаны на двух подходах: на оценке изменений на геномном (по наличию мутантного гена) или на белковом уровнях (по экспрессии мутантного белка).

Цель исследования – установить ассоциации генетических вариантов генов и вирусной ДНК/РНК при раке печени и раке толстого кишечника.

Материал и методы

Исследование проведено на базе Института биохимии биологически активных соединений

НАН Беларуси и Гродненского государственного медицинского университета.

Материалом для исследования были образцы ткани и крови лиц белорусской этнопринадлежности с морфологически установленным РТК и РП (время установления диагноза от 6 мес. до 13 лет). В соответствии с Международной гистологической классификацией образцы ткани опухоли ($n=130$, 106 клинических случаев) при РТК были представлены: С18 – рак ободочной кишки, С19 – рак ректосигмоидного соединения, С20 – рак прямой кишки ($n=68$), включая 8,5% ($n=11$) случаев метастазов РТК в легкое, в лимфатические узлы брюшной полости, в печень. Образцы ткани РП (С22, $n=62$) представлены гепатоцеллюлярным раком (ГЦР) [10].

Пациенты были прооперированы по клиническим показаниям в онкологическом диспансере. Патоморфологический материал исследован в областном клиническом патологоанатомическом бюро. Кровь для исследования ($n=129$) была взята в период нахождения пациентов на лечении в стационаре в соответствии с действующими клиническими протоколами.

Возраст обследуемых на момент постановки диагноза составил 29-87 лет ($Me - 61,8\pm 13,7$), женщин 40,8% ($n=53$), мужчин – 59,2% ($n=77$).

Выполнено 520 исследований детекции ДНК/РНК генома следующих вирусов: Эпштейна-Барр (ВЭБ, HHV4), гепатита В (ВГВ/НВВ), гепатита С (ВГС/НСВ), папилломы человека (ВПЧ/HPV), цитомегаловирус (ЦМВ/CMV), простого герпеса 1/2 типа (ВПГ 1/2; HSV 1/2) и герпеса 6 типа (HHV6).

Молекулярно-биологическое исследование генов BRCA1 (экзон 2, экзон 5, экзон 11, экзон 20), BRCA2 (экзон 11) и MSH2 (экзон 1-16) выполнено в 129 случаях (анализ 1077 детекций).

Выделение ДНК/РНК (ПЦР) из образцов ткани проводилось согласно инструкциям производителя: тест-система «Applied Biosystems» (США), «MagneSil Genomic, Fixed System» (Promega, США) (США), «QIAamp DNA Blood Mini Kit», Qiagen (Германия). Геномную ДНК/РНК из образцов крови выделяли при помощи наборов «ДНК/РНК Сорб В» (Россия) в соответствии с инструкцией. Амплификация экзонов генов проведена при помощи наборов Pronto Diagnostics Ltd. (Израиль) для детекции гена BRCA (exon 5, exon 2 – 185delAG), exon 11 – 4145delA, exon 20 – 5382insC в гене BRCA1; exon 11 – 6174delT в гене BRCA2) и детекции экзонов гена hMSH2 (MLPA Tests: HNPCC - deletion/duplication – Diagnosis of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC), Pronto Diagnostics Ltd. (Израиль). Для определения изменений в экзонах гена hMSH2 использован оригинальный набор реагентов на основе разработанных отечественных праймеров [11, 12].

Амплификация ДНК/РНК вирусов выполнена по заданному протоколу в автоматическом режиме на амплификаторе-термоциклере «RotorGene» (Германия), тест-системы «Amplisens» (Россия), дополнительный контроль количественных и качественных характеристик ДНК/РНК – на спектрофотометре «BioPhotometer Plus» (Eppendorf, Германия).

Группа контрольных исследований представлена образцами крови 80 практически здоровых лиц с отсутствием злокачественного новообразования и вирусных инфекций на момент обследования, среди которых было 50 мужчин (62,5%) и 30 женщин (37,5%), среднего возраста 56,5±8,3 года.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием стандартного пакета прикладных статистических программ SPSS. Различия между изучаемыми параметрами признавали достоверным при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Среди респондентов контрольной группы ($n=80$), у которых не было родственников с онкопатологией, встречаемость мутаций генов (BRCA1, BRCA2, hMSH2) составила 1,25% для BRCA 1 экзон 20 (женщина, 47 лет, сельский житель) и 1,25% для hMSH2 экзон 11 (женщина, 52 года, городской житель). Мутаций экзонов гена BRCA2 в контроле не обнаружено.

Встречаемость мутаций в экзонах генов в образцах тканей и крови лиц с установленным диагнозом РТК представлена в таблице 1.

Общее количество мутаций в образцах тканей при РТК составило 86/7,98% от общего количества исследований ($n=1077$).

В процессе оценки 432 исследований по 1-16 экзону гена hMSH2 в образцах тканей при РТК показано, что встречаемость мутаций составила 78/18,05%. Как видно из таблицы 1, количество изменений в гене hMSH2 варьировало: наибольшее в экзоне 9 гена hMSH2 (17/63%), далее экзон 6 (14/51,9%), экзон 8 (10/37%), экзон 1 и экзон 11 (по 8/29,6%), экзон 2 (6/22,2%), экзон 3 и экзон 10 (по 4/14,8%), экзон 14 (2/7,4%), экзон 12 (1/3,7%). В других исследуемых экзонах гена изменений не обнаружено.

В образцах ткани пациентов с установленным диагнозом РТК мутации гена BRCA 1 и BRCA 2 детектированы с частотой от 0,77% (BRCA 1: экзон 5, экзон 11) до 1,55% (BRCA 1: экзон 2, экзон 20; BRCA 2: экзон 11) и только у лиц женского пола ($n=8$). Удельный вес детектируемых мутаций, от всех исследуемых образцов лиц с диагнозом РТК составил 1,24% от общего количества исследований ($n=645$), или 28,5% – от исследуемых образцов у лиц женского пола с диагнозом РТК ($n=28$).

Общее количество мутаций в образцах крови при РТК составило 22/2,04% от общего количества исследований ($n=1077$).

Оценивая встречаемость генетических изменений в образцах крови у лиц с установленным диагнозом РТК показано, что детектируемость мутаций составила 18/4,17% в экзонах гена hMSH2. Как видно из таблицы 1, количество изменений в гене составило: экзон 11 гена hMSH2 (8/29,63%), экзон 6 (4/14,81%), экзон 10 (3/11,11%), экзон 1, экзон 8 и экзон 12 (по 1/3,7%). В других исследуемых экзонах гена hMSH2 изменений не обнаружено. Параллельное исследование «in vitro» по определению экзонов гена hMSH2 с применением отечественных праймеров показало 100% соответствие наших результатов с данными при использовании коммерческих наборов.

Детектированные в крови мутации гена hMSH2 присутствовали и в образцах тканей, в то же время количество изменений в гене hMSH2 в образцах тканей при РТК было выше, чем в крови: 86/7,98% и 22/2,04% ($p < 0,05$).

При проведении анализа встречаемости исследованных мутаций в опухолевой ткани по эк-

Таблица 1 – Частота выявления мутаций генов BRCA 1/2 и MSH2 в образцах ткани и крови при РТК (абс./%)

Исследуемый ген, экзон	n	Мутации, ткань		Мутации, кровь	
		количество	удельный вес, %	количество	удельный вес, %
BRCA 1 экзон 5	129	1*	0,77	0**	0,00
BRCA экзон 2	129	2*	1,55	0**	0,00
BRCA 1 экзон 20	129	2*	1,55	2**	1,55
BRCA 1 экзон 11	129	1*	0,77	1**	0,78
BRCA 2 экзон 11	129	2*	1,55	1**	0,78
MSH2, экзон 1	27	8	29,6	1	3,70
MSH2, экзон 2	27	6	22,2	0	0,00
MSH2, экзон 3	27	4	14,8	0	0,00
MSH2, экзон 4	27	0	0,0	0	0,00
MSH2, экзон 5	27	0	0,0	0	0,00
MSH2, экзон 6	27	14	51,9	4	14,81
MSH2, экзон 7	27	4	14,8	0	0,00
MSH2, экзон 8	27	10	37,0	1	3,70
MSH2, экзон 9	27	17	63,0	0	0,00
MSH2, экзон 10	27	4	14,8	3	11,11
MSH2, экзон 11	27	8	29,6	8	29,63
MSH2, экзон 12	27	1	3,7	1	3,70
MSH2, экзон 13	27	0	0,0	0	0,00
MSH2, экзон 14	27	2	7,4	0	0,00
MSH2, экзон 15	27	0	0,0	0	0,00
MSH2, экзон 16	27	0	0,0	0	0,00

Примечание: * – образцы тканей лиц женского пола (n=28 – лица женского пола, от общего количества исследуемых образцов).

зонам гена hMSH2 (разведочный и корреляционный анализ) установлено, что компонента экзона 10, экзона 11 и экзона 12 гена hMSH2 с выявленной мутационной характеристикой в крови (вероятностная наследственная природа изменений) обеспечивает варьирование в ткани:

– экзоны 11 и 3 ($r_s=0,414362$; $p<0,05$), экзоны 11 и 6 ($r_s=0,462949$; $p<0,05$), экзоны 11 и 10 ($r_s=0,414362$; $p<0,05$);

– экзоны 10 и 6 ($r_s=0,401859$; $p<0,05$), экзоны 10 и 12 ($r_s=0,470270$; $p<0,05$);

– экзоны 12 и 14 ($r_s=0,693375$; $p<0,05$).

Анализ обнаруженных мутаций в ткани показал, что компонента экзона 1, 2, 3, 6, 7, 8 и 9 гена hMSH2 (вероятностная спонтанная и/или индуцированная природа генетических изменений) обеспечивает варьирование в ткани:

– экзона 1 с экзонами 3 ($r_s=0,642685$; $p<0,05$) и экзонами 7 ($r_s=0,414362$; $r_s=0,529414$ $p<0,05$);

– экзона 6 с экзонами 7, экзонами 8 и экзонами 9 ($r_s=0,401859$; $r_s=0,585568$; $r_s=0,488921$; $p<0,05$);

– экзона 8 с экзонами 6 и 9 ($r_s=0,585568$; $r_s=0,429412$ $p<0,05$).

Во всех случаях анализа образцов опухолевой ткани как главной компонента выделен экзон 6 гена hMSH2 (мощность – 0,921). Анализ множественной регрессии предсказанного значения возраста вероятного развития РТК при носительстве мутации гена hMSH2 (экзон 6) установлен для возраста $58,5\pm 3,7$ года ($-95,0\%$ ИС=50,7 года, $+95,0\%$ ИС=66,3 года, $t=15,538$, $p=0,00001$).

В образцах ткани пациентов с установленным диагнозом РТК мутации гена BRCA 1 и BRCA 2 детектированы с частотой от 0,78% до 1,55% и только у 4-х лиц женского пола (табл. 1). Удельный вес детектируемых мутаций, от всех исследуемых образцов лиц с диагнозом РТК составил 0,62% от общего количества исследований (n=645), или 14,24% от исследуемых образцов у лиц женского пола с диагнозом РТК (n=28).

Мутации гена BRCA 1 и BRCA 2 в крови женщин детектированы в 4/3,1% случаях от всех исследуемых образцов лиц с диагнозом РТК.

При оценке встречаемости мутаций генов BRCA 1/2 среди женщин при РТК установлены значимые ранговые корреляции с экзонами гена

hMSH2: экзон 11 гена BRCA 2 и экзон 5 гена BRCA 1 ($r_s=0,704714$; $p<0,05$), экзон 2 гена BRCA 1 ($r_s=0,493197$; $p<0,05$) и экзоны 14 гена hMSH2 и экзон 2 гена BRCA 1 ($r_s=0,460$; $r_s=0,461$ $p<0,05$).

Значение мутации гена как главной компоненты у женщин с РТК распределена по мощностям: 1-я мощность (0,932) – экзон 11 гена BRCA 2; 2-я (0,627) – экзон 5 гена BRCA 1; 3-я (0,295) – экзон 2 гена BRCA 1.

Встречаемость мутаций в экзонах генов в образцах ткани и крови лиц с установленным диагнозом РПЯ представлена в таблице 2.

Общее количество мутаций в образцах при РП составило 58/6,13% в образцах опухолевой ткани и 8/0,85% в образцах крови, от общего количества ($p=0,004$).

Встречаемость генетических изменений в гене hMSH2 по 1-16 экзону гена составила 52/15,48% в образцах тканей при РП. Как видно из таблицы 2, количество изменений в гене варьировало: наибольшее в экзоне 9 гена hMSH2 (11/52,38%), экзоне 1 (10/47,62%), экзоне 6 (6/28,57%), экзоне 8 (5/23,81%), экзоне

2 (4/19,05%), экзонах 1 и 11 (по 8/29,6%), экзоне 2 (6/22,2%), экзонах 4, 12 и 16 (по 3/14,29%), экзонах 7 и 14 (по 2/9,52%), экзонах 3, 5 и 10 (по 1/4,76%).

Детектируемость мутаций в гене hMSH2 в образцах крови у лиц с РП составила 6/1,79%. Одновременное присутствие мутации гена hMSH2 в образцах крови и опухолевой ткани у пациентов позволяет предположить наследственный механизм возникновения РП.

В образцах опухолевой ткани и крови пациентов с диагнозом РП мутации гена BRCA 1 и BRCA 2 детектированы с частотой 0,63% в ткани и 0,21% в крови от числа всех исследуемых образцов ($n=946$). Анализ удельного веса изменений в гене среди лиц женского пола с этим диагнозом показал, что на образцы ткани приходится 6/24,0% случаев, крови – 2/8,0% от 25 женщин ($p<0,05$).

Встречаемость мутаций генов BRCA 1/2 среди лиц женского пола имела значимые ранговые корреляции при РП с экзонами гена hMSH2:

– экзон 5 ген BRCA1 и экзон 11 гена BRCA2 ($r_s=0,704179$; $p<0,05$);

Таблица 2 – Частота выявления мутаций генов BRCA 1/2 и MSH2 в образцах ткани и крови у лиц с РП (абс./%)

Исследуемый ген, экзон	n	Мутации, ткань		Мутации, кровь	
		количество	удельный вес, %	количество	удельный вес, %
BRCA 1 экзон 5	122	1*	0,82	1*	0,82
BRCA 1 экзон 2	122	1*	0,82	1*	0,82
BRCA 1 экзон 20	122	2*	1,64	0*	0,00
BRCA 1 экзон 11	122	0*	0,00	0*	0,00
BRCA 2 экзон 11	122	2*	1,64	0*	0,00
MSH2, экзон 1	21	10	47,62	1	4,76
MSH2, экзон 2	21	4	19,05	0	0,00
MSH2, экзон 3	21	1	4,76	0	0,00
MSH2, экзон 4	21	3	14,29	0	0,00
MSH2, экзон 5	21	1	4,76	0	0,00
MSH2, экзон 6	21	6	28,57	1	4,76
MSH2, экзон 7	21	2	9,52	0	0,00
MSH2, экзон 8	21	5	23,81	0	0,00
MSH2, экзон 9	21	11	52,38	3	14,29
MSH2, экзон 10	21	1	4,76	0	0,00
MSH2, экзон 11	21	0	0,00	0	0,00
MSH2, экзон 12	21	3	14,29	1	4,76
MSH2, экзон 13	21	0	0,00	0	0,00
MSH2, экзон 14	21	2	9,52	0	0,00
MSH2, экзон 15	21	0	0,00	0	0,00
MSH2, экзон 16	21	3	14,29	0	0,00
Всего	946	58	6,13	8	0,85

Примечание: * – образцы тканей лиц женского пола ($n=25$ – лица женского пола, от общего количества исследуемых образцов).

– экзон 20 гена BRCA1 и экзон 10 гена hMSH2 ($r_s=0,689202$; $p<0,05$), экзон 6 гена hMSH2 ($r_s=0,512989$; $p<0,05$) и экзон 14 гена hMSH2 ($r_s=0,447368$; $p<0,05$);

– экзон 5 гена BRCA1 и экзон 11 гена BRCA2 ($r_s=0,704181$; $p<0,05$);

– экзон 2 гена BRCA1 и экзон 11 гена BRCA2 ($r_s=0,704178$; $p<0,05$).

По результатам исследования мутаций в ткани и крови по экзонам генов hMSH2, BRCA1 и BRCA2 (разведочный и корреляционный анализы) установлено, что компонента экзона 6 и экзона 12 гена hMSH2 и экзона 5 гена BRCA1 с выявленной мутационной характеристикой в крови (вероятностной наследственной, вероятностной спонтанной и/или индуцированной) обеспечивает варьирование следующих изменений в ткани:

– экзон 8 гена hMSH2 и экзон 11 гена BRCA2 ($r_s=0,580381$; $p<0,05$), экзон 9 гена hMSH2 ($r_s=0,533002$; $p<0,05$);

– экзон 1 гена hMSH2 и экзон 11 гена hMSH2 ($r_s=0,508747$; $p<0,05$);

– экзон 3 гена hMSH2 и экзон 12 гена hMSH2 ($r_s=0,547723$; $p<0,05$);

– экзон 10 hMSH2 и экзон 12 гена hMSH2 ($r_s=0,547723$; $p<0,05$), экзон 14 гена hMSH2 ($r_s=0,689202$; $p<0,05$);

– экзон 6 гена hMSH2 и экзон 2 гена hMSH2 ($r_s=0,766965$; $p<0,05$), экзон 10 гена hMSH2

($r_s=0,689202$; $p<0,05$), экзон 12 гена hMSH2 ($r_s=0,645497$; $p<0,05$), экзон 14 гена hMSH2 ($r_s=0,794719$; $p<0,05$).

Во всех случаях анализа (факторный) как главная компонента выделено изменение в экзонах 6 ($F=0,82977$, $p<0,05$) и 12 гена hMSH2 ($F=0,73855$, $p<0,05$). Анализ множественной регрессии предсказанного значения возраста вероятного развития РП при носительстве мутации установлен для гена hMSH2: экзон 6 – $61,4 \pm 3,4$ года ($-95,0\%$ ИС= $54,2$ года, $+95,0\%$ ИС= $68,5$ лет, $t=18,034$, $p=0,00001$), экзон 12 – $61,7 \pm 3,07$ лет ($-95,0\%$ ИС= $55,3$ года, $+95,0\%$ ИС= $68,1$ год, $t=20,077$, $p=0,0001$).

Встречаемость ДНК/РНК вирусов в образцах тканей лиц с установленным диагнозом РТК и РП представлена в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, при РТК обнаружены следующие ДНК/РНК вирусы: ВПГ 1/2 типов – $86,8\%$, HHV6 – 25% , ВЭБ – $19,1\%$, ЦМВ – $10,3\%$, HCV – $4,4\%$, HBV – $2,94\%$. При РП выделение вирусной ДНК/РНК составило: ВПГ 1/2 – $56,1\%$, ЦМВ – $17,1\%$, HCV – $17,1\%$, HHV6 – $24,4\%$, HBV – $4,9\%$, ВПЧ – $4,1\%$, ВЭБ – $2,4\%$. Микст-персистирование вирусов в тканях опухолей (более одного ДНК/РНК в одном образце) было представлено сочетаниями:

– при РП ($n=11$): 2 случая у мужчин (ЦМВ и HHV6); 1 случай у женщины (ЦМВ и HCV); 1 случай у мужчины (ВПГ 1/2 типа + HCV + HHV6);

Таблица 3 – Частота выявления ДНК/РНК вирусов в образцах ткани при раке толстого кишечника и раке печени, абс./%

Патология и локализация	Общее число	Женский		Мужской	
		n	%	n	%
<i>Рак толстого кишечника</i>					
ВПЧ (HPV)	68	0	0	0	0
ВПГ 1/2 типов	68	48	70,6	11	16,2
ЦМВ	68	4	5,9	3	4,4
ВЭБ	68	3	4,4	10	14,7
HBV	68	1	1,5	1	1,5
HCV	68	0	0	3	4,4
HHV6	68	3	4,4	14	20,6
<i>Рак печени</i>					
ВПЧ	41	0	0	2	4,9
ВПГ 1/2 типов	41	15	36,6	8	19,5
ЦМВ	41	2	4,9	5	12,2
ВЭБ	41	1	2,4	0	0
HBV	41	1	2,4	1	2,4
HCV	41	1	2,4	6	14,6
HHV6 (ВПГ6)	41	1	2,4	9	21,9

2 случая у женщин (ВПГ 1/2 типа и ННВ6); 1 случай у мужчины (НСV и ННВ6); 1 случай у мужчины (НВV и ВЭБ); 2 случая у мужчины (ВПГ1/2 типа и ЦМВ); 1 случай у женщины (ЦМВ + НCV + ННВ6);

– при РТК (n=8): по 1 случаю у мужчин (ВЭБ + ННВ6; ВПГ1/2 типа + ВЭБ; ВПГ1/2 типа + ННВ6; НCV + ННВ6); 3 случая комбинации ЦМВ+ВЭБ (2 мужчины, 1 женщина); 1 случай у мужчины ЦМВ+ВЭБ+ННВ6.

Удельный вес комбинированного носительства вирусной ДНК/РНК при РП – 11/9,1%, при РТК – 8/6,6%.

Между оцененными генетическими изменениями в опухолевой ткани и образцах крови лиц с РТК и РП установлен ряд достоверных зависимостей с ДНК и РНК вирусов. В частности, при РТК корреляционные связи и зависимости у вирусов показаны при следующих генетических изменениях:

– при носительстве мутаций гена BRCA 1 экзон 5: ВПГ 1/2 типов ($r_s=0,265025$; $p<0,05$);

– при носительстве мутаций гена BRCA 1 экзон 2: ВПЧ 16/18 типов ($r_s=0,702038$; $p<0,05$), ВПЧ (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) типов ($r_s=0,485507$; $p<0,05$);

– при носительстве мутаций гена BRCA 1 экзон 20: ННВ6/ВПГ6 типа ($r_s=0,292141$; $p<0,05$);

– при носительстве мутаций гена BRCA 2 экзон 11: ВПЧ 16/18 типов ($r_s=0,702038$; $p<0,05$); ВПЧ (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) типов ($r_s=0,486501$; $p<0,05$);

– при носительстве мутаций гена hMSH 2 экзон 10: НВV ($r_s=0,470270$; $p<0,05$);

– при носительстве ВЭБ: ЦМВ ($r_s=0,454234$; $p<0,05$);

– при носительстве ННВ6/ВПГ 6 типа: НCV ($r_s=0,419270$; $p<0,05$);

– при носительстве НCV: ВПЧ (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) типов ($r_s=0,327592$; $p<0,05$).

При РП достоверные корреляционные связи и зависимости у вирусов показаны при следующих генетических изменениях:

– при носительстве мутаций гена BRCA 1 экзон 5: ВПГ 1/2 типов ($r_s=0,291969$; $p<0,05$);

– при носительстве мутаций гена BRCA 1 экзон 2: ЦМВ ($r_s=0,291969$; $p<0,05$), НВV ($r_s=0,261354$; $p<0,05$);

– при носительстве мутаций гена BRCA 2 экзон 11: ВПЧ 16/18 типов ($r_s=0,702038$; $p<0,05$); ВПЧ (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) типов ($r_s=0,486501$; $p<0,05$);

– при носительстве ВЭБ: НВV ($r_s=0,281184$; $p<0,05$);

– при носительстве мутаций гена hMSH 2 экзон 9: НCV ($r_s=0,391965$; $p<0,05$).

Заключение

Среди лиц здоровой популяции частота мутаций в генах BRCA1 и hMSH2 составила 1,25%, в отличие от гена BRCA2, в котором изменения не детектировались.

Общее количество мутаций генов BRCA1, BRCA2, hMSH2 в образцах крови у лиц с диагнозом РТК составило 2,04% при частоте изменений в гене hMSH2 (экзон 1-16) – 4,17%, что значительно ниже частоты детектируемых мутаций в этих же генах в образцах опухолевой ткани – 7,98% ($p=0,003$) при частоте генетических изменений в гене hMSH2 (экзон 1-16), равной 18,05% ($p=0,001$).

Факт обнаружения мутаций гена BRCA1/2 и hMSH2 у лиц с установленным диагнозом РТК одновременно в крови и в образцах тканей позволяет предположить возможное наследственное происхождение опухоли. Высказанное предположение подтвердили результаты разведочного и корреляционного анализа мутаций в ткани по экзонам гена hMSH2. Во всех случаях как главная компонента выделен экзон 6 гена hMSH2 (мощность – 0,921). Анализ множественной регрессии предсказанного значения возраста вероятного развития РТК при носительстве мутации гена hMSH2 (экзон 6) установлен для возраста $58,5\pm 3,7$ года ($p=0,00001$).

Анализ встречаемости мутаций генов BRCA 1/2 среди женщин показал их зависимость при РТК с экзонами гена hMSH2 ($p<0,05$). Наличие мутаций в генах BRCA 1/2 (экзон 11 гена BRCA 2, экзон 5 гена BRCA 1, экзон 2 гена BRCA 1) у женщин следует рассматривать как потенциальный риск развития РТК.

Общее количество мутаций при РП составило 6,13% для образцов опухолевых тканей и 0,85% для образцов крови ($p=0,004$). Встречаемость мутаций генов BRCA 1/2 среди лиц женского пола при РП коррелировала с изменениями в экзонах 6 и 12 гена hMSH2 и гена BRCA1 (экзон 5), $p<0,05$.

Наличие мутаций в гене hMSH2 при РП в возрастной группе $61,4\pm 3,4$ года (экзон 6) и группе $61,7\pm 3,07$ года (экзон 12), следует рассматривать как потенциальный риск развития РП.

Несмотря на важную роль наследственного фактора в формировании РТК и РП, остается открытым вопрос возрастающего количества мутаций (спонтанные, индуцированные или спорадические) под действием модифицируемых факторов риска, к которым относятся вирусные агенты.

Установленные ассоциации мутаций исследованных генов в крови и ткани опухолей с различными вирусами позволяют заключить, что наиболее высокий онкогенный потенциал несут в себе ВПЧ, ЦМВ, ВВП 1/2, HHV6, HBV и HCV, что, несомненно, необходимо дальше исследовать. На сегодняшний день можно однозначно признать, что вирусы являются значимым фактором риска развития РТК и РП в связи с их способностью перепрограммирования генома клетки за счет своего генетического потенциала.

Основные механизмы, приводящие к более высокому риску развития РТК и РП, до сих пор неясны, в связи с чем необходимы дальнейшие меры по профилактике и тщательному клинико-лабораторному мониторингу, включая скрининг на маркеры потенциально онкогенных вирусов.

Применение набора реагентов для детекции экзонов гена hMSH2 на основе разработанных отечественных праймеров показало высокую информативность результатов и их соответствие результатам исследования коммерческим наборам реагентов.

Литература

1. Рак в Беларуси: цифры и факты. Анализ данных Белорусского канцер-регистра за 2010-2019 гг. / А. Е.

References

1. Okeanov AE, Moiseev PI, Levin LF, Evmenenko AA, Ipatiy TB; Polyakov SL, red. Cancer in Belarus: figures and facts. Analysis of data from the Belarusian Cancer Registry for 2010-2019. Minsk, RB: RNPTsOMR im NN Aleksandrova; 2020. 298 p. (In Russ.)
2. International Agency for Research of Cancer. Cancer Today. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020>. [Accessed 08th December 2022].
3. Anwanwan D, Singh SK, Singh S, Saikam V, Singh R. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2020 Jan;1873(1):188314. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.188314
4. Blair VR. Familial Gastric Cancer: Genetics, Diagnosis and Management. *Surg Oncol Clin N Am*. 2012 Jan;21(1):35-56. doi: 10.1016/j.soc.2011.09.003

- Океанов [и др.] ; под ред. С. Л. Полякова. Минск : РНИЦОМР им. Н. Н. Александрова, 2020. 298 с.
2. Cancer Today [Electronic resource] / International Agency for Research of Cancer. Mode of access: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020>. Date of access: 08.12.2022.
3. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches / D. Anwanwan [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*. 2020 Jan. Vol. 1873, N 1. 188314.
4. Blair, V. R. Familial Gastric Cancer: Genetics, Diagnosis and Management / V. R. Blair // *Surg. Oncol. Clin. N. Am*. 2012 Jan. Vol. 21, N 1. P. 35–56.
5. Risk and epidemiological time trends of gastric cancer in Lynch syndrome carriers in the Netherlands / L. G. Capelle [et al.] // *Gastroenterology*. – 2010 Feb. Vol. 138, N 2. P. 487–492.
6. An extended Li-Fraumeni kindred with gastric carcinoma and a codon 175 mutation in TP53 / J. M. Varley [et al.] // *J. Med. Genet*. 1995 Dec. Vol. 32, N 12. P. 942–945.
7. High cancer risk and increased mortality in patients with Peutz-Jeghers syndrome / M. G. F. van Lier [et al.] // *Gut*. 2011 Feb. Vol. 60, N 2. P. 141–147.
8. Ulvik, R. J. The liver in haemochromatosis / R. J. Ulvik // *Trace. Elem. Med. Biol*. 2015. Vol. 31. P. 219–224.
9. Kamihara, J. Germline TP53 mutations and the changing landscape of Li-Fraumeni syndrome / J. Kamihara, H. Q. Rana, J. E. Garber // *Hum. Mutat*. 2014 Jun. Vol. 35, N 6. P. 654–662.
10. Invasion of veins by carcinoma of rectum: method of detection, histological features and significance / I. C. Talbot [et al.] // *Histopathology*. 1981 Mar. Vol. 5, N 2. P. 141–163.
11. Способ и набор для определения мутаций в гене hMSH2 в образце биологического материала человека : заявка Респ. Беларусь : МПК G 01 N 33/48 / О. Е. Кузнецов, О. В. Горчакова ; заявитель Кузнецов О. Е., Горчакова О. В. № a20210332 ; заявл. 29.11.21, Афіц. бюл.
12. Горчакова, О. В. Метод выявления мутаций в гене hMLH1 при опухолях кишечника / О. В. Горчакова, О. Е. Кузнецов // *Мед. новости*. 2019. № 2. С. 76–79.

Поступила 08.11.2022 г.

Принята в печать 07.12.2022 г.

5. Capelle LG, Van Grieken NCT, Lingsma HF, Steyerberg EW, Klokmans WJ, Bruno MJ, et al. Risk and epidemiological time trends of gastric cancer in Lynch syndrome carriers in the Netherlands. *Gastroenterology*. 2010 Feb;138(2):487-92. doi: 10.1053/j.gastro.2009.10.051
6. Varley JM, McGown G, Thorncroft M, Tricker KJ, Teare MD, Santibanez-Koref MF, et al. An extended Li-Fraumeni kindred with gastric carcinoma and a codon 175 mutation in TP53. *J Med Genet*. 1995 Dec;32(12):942-5. doi: 10.1136/jmg.32.12.942
7. Van Lier MGF, Westerman AM, Wagner A, Looman CWN, Wilson JHP, de Rooij FWM, et al. High cancer risk and increased mortality in patients with Peutz-Jeghers syndrome. *Gut*. 2011 Feb;60(2):141-7. doi: 10.1136/gut.2010.223750
8. Ulvik RJ. The liver in haemochromatosis. *Trace Elem Med Biol*. 2015;31:219-24. doi: 10.1016/j.jtemb.2014.08.005

9. Kamihara J, Rana HQ, Garber JE. Germline TP53 mutations and the changing landscape of Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat.* 2014 Jun;35(6):654-62. doi: 10.1002/humu.22559
10. Talbot IC, Ritchie S, Leighton M, Hughes AO, Bussey HJ, Morson BC. Invasion of veins by carcinoma of rectum: method of detection, histological features and significance. *Histopathology.* 1981 Mar;5(2):141-63. doi: 10.1111/j.1365-2559.1981.tb01774.x
11. Kuznetsov OE, Gorchakova OV. Method and kit for determination of mutations in the hMSH2 gene in a sample of human biological material: zayavka Resp Belarus': MPK G 01 N 33/48. № a20210332; zayavl 29.11.21, Afits byul. (In Russ.)
12. Gorchakova OV, Kuznetsov OE. A method for detecting mutations in the hMLH1 gene in intestinal tumors. *Med Novosti.* 2019;(2):76-9. (In Russ.)

Submitted 08.11.2022

Accepted 07.12.2022

Сведения об авторах:

О.Е. Кузнецов – к.б.н., доцент, директор Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, <https://orcid.org/0000-0002-1348-8688>,

E-mail: olegkuznetsov@inbox.ru – Кузнецов Олег Евгеньевич;

В.М. Цыркунов – д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней, Гродненский государственный медицинский университет, <https://orcid.org/0000-0002-9366-6789>.

Information about authors:

A.E. Kuzniatsou – Candidate of Biological Sciences, associate professor, director of the Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, <https://orcid.org/0000-0002-1348-8688>,
E-mail: olegkuznetsov@inbox.ru – Aleh E. Kuzniatsou;

V.M. Tsyrukunov – Doctor of Medical Sciences, professor of the Chair of Infectious Diseases, Grodno State Medical University, <https://orcid.org/0000-0002-9366-6789>.