

2. Drept semne ale metodelor radioimagistice în favoarea MRD, în opinia noastră pot servi: D2-D3 cu diametrul mai mare de 4 cm, D3 situat caudal de L3 ajungând până la nivelul L5, ansa adăugătoare la nivel de D3 sau D4, prolabarea duodenului prin mezocolon, situarea joncțiunii duodeno-jejunale în dreapta coloanei vertebrale, duoden mobil în D3 și D4, situat intraperitoneal, mezou comun cu jejunul; pilor hipo- sau hipertrofiat, biant, cu diametrul mai mare de 4 cm. Sensibilitatea radioscopiei tradiționale a constituit 96.28%, duodenografiei relaxante – 90.19%, CT- 90%, scintigrafiei – 66,67%.

3. Algoritmul diagnostic al MRD va include consecutiv și obligatoriu FGDS, pH –metria, radioscopia baritată gastro-duodenală tradițională, cu contrastare obișnuită și în regim de contrastare dublă, duodenografia tridimensională prin CT, biliscintigrafia, EGEG periferică.

4. Evoluția cronică a malrotației duodenale, asociată cu duodenostază, duce la dereglări a nivelului pH-ului gastric.

5. În toate cazurile de duodenostază se semnalează prezența refluxului de bilă în stomac, de diferită durată și gravitate.

6. Refluxul duodenogastral are impact asupra tuturor compartimentelor gastrice.

7. În ulcerul simptomatic, instalat pe fondal de MRD, asociată cu duodenostază, tratamentul chirurgical va consta în rezecție gastrică de tip Roux sau Balfour, care asigură excluderea duodenului din pasaj, iar patologia căii biliare principale va beneficia selectiv de papilotomie în Oddita stenozantă cu litextractie, iar în megacoledoc de exereză supraduodenală de coledoc și anastomoză cu ansa „Y a la Roux”.

### Bibliografie

1. ANGELESCU N. Megaduodenul secundar în *Tratat de Patologie Chirurgicală*, București 2001 1516 - 1518.
2. BASLEY V. BRAUN R. Arteriomezenteric obstruction of duodenum. *Ann. Surg.*- 1954.
4. PRIPA V. Posibilitățile radiodiagnosticului modern al malrotației duodenale și consecințele acesteia – 2007.
5. HOTINEANU V.T. Megacoledocul secundar. „Arta Medica”, 2003 Nr.1.
6. HOTINEANU V.T., GOREA D.V., Malrotația duodenală – factor etiopatogenetic al ulcerelor simptomatice duodenale. *Congresul XXIII internațional al chirurgilor din România, Oradea 2006.*
7. HOTINEANU V., *Chirurgie curs selectiv 2008*; 286 - 290
8. Витебский Я.Д. Хронические нарушения дуоденальной проходимости и язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки// Челябинск: Южно-Уральск. кн.изд. во.1976. 190с.
9. Выржиковская К.Я. Рентгенодиагностика заболеваний двенадцатиперстной кишки. В.Бедроз. 1963-252 с.

## DIAGNOSTICUL GENETIC LA PACIENȚII CU NEOPLAZIE COLORECTALĂ

### GENETIC DIAGNOSTIC IN COLORECTAL NEOPLASIA

**V. Hotineanu , L.Palii, N. Barbacar**

*LCS Chirurgie reconstructivă a tractului digestiv,*

*Catedra 2 Chirurgie, USMF “Nicolae Testemițanu”,*

*Laboratorul – Organizare moleculară a genomului și expresia genelor, Inst. de Genetica AȘ RM*

### Rezumat

Unul din pericolele majore ale polipozei adenomatoase familiale, sindromului Lynch, precum și ale polipilor simpli (solitari sau multipli) îl constituie evoluția asimptomatică sau subclinică a acestora, care poate decurge mulți ani la rând. Debutul manifestărilor clinice în majoritatea cazurilor este determinată atât de hemoragia colonului, cât și de posibila transformare a maladiilor sus-menționate în CCR. Conform datelor Alianței Cancerului Colonului (ACC) pentru anul 2000, perioada de risc de declanșare a malignizării PAF o constituie vârsta medie de 40 ani, iar al S.Lynch- 44 ani. Trebuie de menționat faptul că, pentru populația generală CCR, se dezvoltă începând vârsta medie de 65 ani. Datorită progreselor înregistrate în perfecționarea metodelor tehnologiei ADN recombinat, astăzi este posibil diagnosticul polipilor colorectali ereditari, ca formă de neoplazie epitelială colo-rectală (NECR), la nivelul genei. Un lot de pacienți cu NECR a fost supus unor investigații genetico-moleculare, în scopul diferențierii clinice dintre subiecții cu adenomi sporadici de cei cu origine ereditară. Identificarea asocierilor genetice dintre spectrele polimorfe de ADN și expresia genică s-a fost efectuat prin intermediul tehnicii RT-PCR.

## Summary

One of the hazards of familial adenomatous polyposis, Lynch syndrome, and of simple polyp (solitary or multiple) is the development of asymptomatic or subclinical thereof, which may arise many years in a row. Onset of clinical manifestations in most cases is determined so bleeding colon, as well as the possible transformation of the above diseases in RCC. According to the Alliance of colon cancer (ACC) for 2000, the period of risk of triggering PAF malignity is the average age of 40 years, and the S.Lynch-44 years. Note that for the general population it grows, starting RAC average age of 65 years.

In the light of the progress achieved in the area of improving the methods of recombinant DNA technology, today it has become possible to diagnose a genetic disease, including the Lynch Syndrome as a form of epithelial colorectal neoplasia (ECRN) at the level of genes. To identify the clinical differences between patients with sporadic adenoma from the ones with hereditary neoplasm, genetical-molecular investigations were carried out on a group of patients diagnosed with ECRN. Identification of genetic associations between polymorphous spectrum of DNA and the genetic expression was done using the RT-PCR technique.

## Scopul lucrării

Implimentarea diagnosticului molecular cu utilizarea tehnicii RT-PCR și examinarea aspectului genetic la pacienții cu neoplazie colorectală (membrilor suspecti din familiile acestora).

## Materiale și metode

Cercetarea științifică actuală reprezintă un studiu experimental genetic, bazat pe analiza materialului clinic de tratament chirurgical, în **perioada 2000-2009, a 84 de pacienți** cu Neoplazie Epitelială Colo-Rectală (NECR), vârsta pacienților varia de la 8 la 79 de ani, raportul dintre bărbați și femeii fiind de aproximativ 1:1, 44 femei (52,4%) și 40 bărbați (47,6%). Cifra nu prea impunătoare de pacienți cu NECR se explică prin faptul că, de regulă, aceștia primesc tratamentul necesar încă în faza prespitalicească.

Lotul luat în studiu aparține categoriei "pacienților complicați" cu patologie complexă, avansată, care adesea este asociată cu o malignizare- fapt determinant în necesitatea efectuării unui diagnostic și tratament calificat în condiții de staționar.

Privitor la distribuția polipilor pe traseul colonic, s-a remarcat o afectare mai frecventă a colonului stâng. Rezultatele obținute se prezintă în tab.1.

Tabelul 1. Distribuția polipilor pe traseul colonic (%)

Localizarea	%
Canalul anal	23
Rect	25
Rect și colonul transvers	1,5
Colonul stâng	17
Colonul transvers	6
Colonul ascendent, transvers și sigmă	3
Colon ascendent	5
Rectosigmă	18,5
Pancolonul	1
Total	100

Examenul histologic a confirmat la toți pacienții originea adenomatoasă a polipilor. La 15 pacienți  $17,9 \pm 4,1\%$  ( $p < 0,001$ ), a fost constatată o malignizare a polipilor, sub forma de adenocarcinom invaziv sau carcinom-in-situ. S-a constat o dependență direct proporțională între dimensiunile adenomului, caracteristicile lui histologice și gradul de malignizare a acestuia, fapt demonstrat în fig. 1.

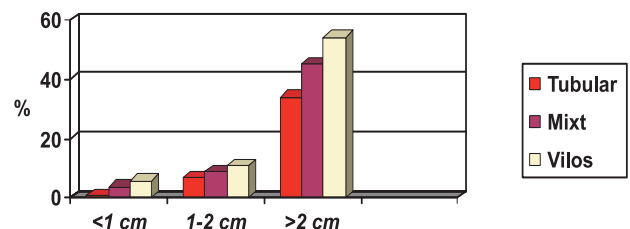


Figura 1. Predominarea fenomenului de malignizare la polipi de diversă structură morfofpatologică

**Examenul genetic** al pacienților cu NECR a inclus cercetarea genetică și a presupus parcurgerea următoarelor etape:

- înregistrarea diagnosticului medical și al informațiilor despre părinți;
- întocmirea arborelui genealogic (pedigriul);
- analiza genealogică pentru stabilirea modului de transmitere;
- aprecierea riscului pentru persoanele aflate în relații cu subiectul studiat;
- analiza moleculară a ADN-ului și ARN-ului prin tehnica PCR și RT-PCR;
- analiza electroforetică a fragmentelor amplificate de ADN;
- determinarea spectrului polimorf (genetic) al genelor, care condiționează apariția NECR (forme ereditare);
- documentarea rezultatelor și analiza statistică a acestora.

Pentru stabilirea riscului s-a ținut cont de incidența bolii respective în populația generală, de etnie, de relațiile genetice cu un individ afectat, de penetranța și de influența mediului.

Investigațiile genetice ale lotului de pacienți (și rudele suspectate) au inclus următoarele etape:

- prelevarea și conservarea materialului biologic (sânge, polipi). Sângele fiind conservat în Sol. EDTA și păstrat în congelator la temperatura de minus-20-30°C. Polipii extirpați în mod nativ au fost congelați la aceeași temperatură. S-a efectuat extracția moleculelor de ADN genomic; fragmentarea moleculelor de ADN cu endonucleaze de restricție; separarea fragmentelor de ADN prin electroforeza în gel; clonarea „in vitro” a genelor caracteristice NECR- **p53**, **Genelor hMLH1 (human Mut L homologue 1)** și **hMSH2 (human Mut S homologue)** prin tehnica reacției RT-PCR (Polymerase Chain Reaction).

Clonarea „in vitro” a genelor sus-menționate prin reacția de înlănțuire a polimerazei (PCR), constă în repetarea nelimitată a unui ciclu de trei reacții și clonarea in vitro a genei sau fragmentului de ADN genomic studiat.

**Rezultate obținute**

**1. Diagnosticul molecular al expresiei genei p53 la lotul cu NECR.** Au fost selectați și utilizați următorii primeri din structura primară a genei p53: 1. p53. 4F1- 5'-CTC TTT TCA CCC ATC TAC AGT CC-3'; 2. p53. 4F 2- 5'-TCT GGG AAG GGA CAG AAG AT-3'.

De asemenea, s-au folosit pe larg markerii moleculari cu dimensiuni diferite: 10 kB; 8 kB; 6 kB; 4 kB; 4 kB; 3 kB; 2,5 kB; 2 kB; 1,5 kB; 1,0 kB; 0,8 kB; 0,6 kB; 0,4 kB; 0,2 kB propuși de compania Eurogentec "Smart" (SUA).

Rezultatul reacției RT-PCR la prezența genei p53 fiind demonstrat în imaginea de mai jos.

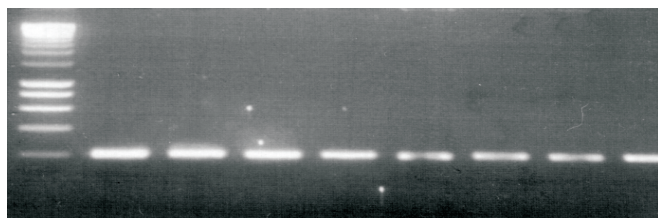


Figura 2. Analiza calitativă a expresiei genei p53 la pacienții cu NECR

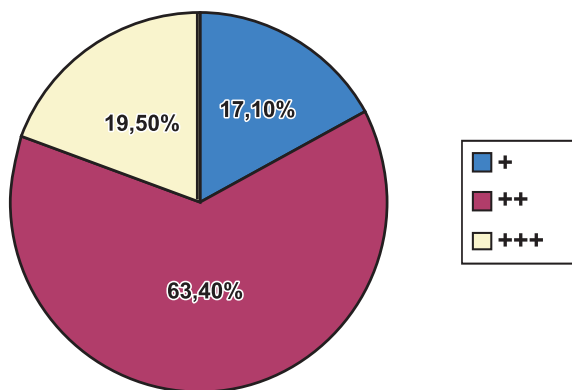


Figura 3. Structura bolnavilor cu testul pozitiv la gena p53

Din numărul total de bolnavi investigați la gena p53, frecvența înregistrată a rezultatelor pozitive este de  $97,6 \pm 2,4\%$  cazuri ( $p < 0,001$ ) cu cota mai pronunțată de gradul II(++) – 63,4%. Structura expresiei pozitive este prezentată în fig.3.

Studierea expresiei genei P53(fig.3), ne-a permis constatarea declanșării procesului de tumorigeneză în faza tardivă. Astfel, această genă a fost considerată ca o oncogenă tardivă, cu scop de control, cu grad variat de expresie.

**2. Instabilitatea minisatelitică a genelor MSH1 și MLH2 și gradul de expresie.**

Bolnavii suspecți la sindromul Lynch au fost investigați la instabilitatea minisatelitelor prezente în genele mismatch-MSH1 și MLH2. Analiza RT-PCR cu utilizarea următorilor primeri caracteristici cancerului colo-rectal ereditar nepolipos: 1. BAT 25 DIR. 5'-TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT-3'; 2. BAT 25 REV. 5'- TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC-3'.

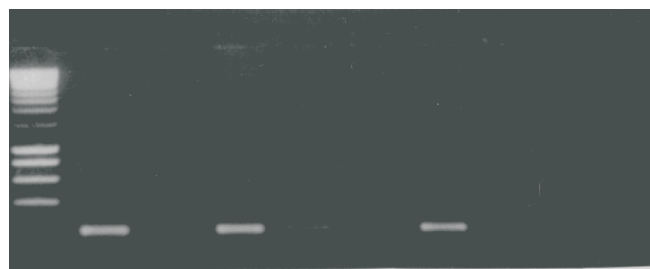


Figura 4. Analiza electroforetică a fragmentelor izolate ale genelor MLH1 și MSH2 prin tehnica RT-PCR

În calitate de matriță în reacția de revers-transcripție s-au utilizat eșantioane de ARN total izolat din celulele tumorogene ale pacienților examinați. Pentru amplificarea fragmentelor de ADN obișnuit s-au utilizat primerii menționați mai sus, selectați din structura genelor **MLH1** și **MSH2**.

Analiza RT-PCR cu utilizarea primerului BAT-25, a demonstrat o acumulare diferențiată a ARN-ului mesager,

Tabelul 2. Frecvența expresivității genei p53 la pacienții cu NECR

Negativ(-)		Grad 1 +		Gradul 2 ++		Gradul 3 +++		Total rez. pozitive	
Abs.	P 1 ± m 1	Abs.	P 2 ± m 2	Abs.	P 3 ± m 3	Abs	P 4 ± m 4	Abs	P 5 ± m 5
2	2,4 ± 1,6 *	14	16,66 ± 4,1 **	52	61,9 ± 5,2 ***	16	19,04 ± 4,2 **	84	100% ****

\*- $p > 0,05$ ; \*\*- $p < 0,05$ ; \*\*\*- $p < 0,01$ ; \*\*\*\*- $p < 0,001$ .

Tabelul 3. Frecvența expresiei genelor MSH1 și MLH2 la pacienții cu NECR

Negativ(-)		Grad 1 +		Gradul 2 ++		Total rez. pozitive	
Abs.	P 1 ± m 1	Abs.	P 2 ± m 2	Abs.	P 3 ± m 3	Abs.	P 5 ± m 5
46	54,8 ± 5,4 ***	22	26,2 ± 4,8 **	16	19,0 ± 4,3 **	38	45,2 ± 5,4 ***

\*\*- $p < 0,05$ ; \*\*\*- $p < 0,01$ .

Tabelul 4. Raportul frecvențelor în funcție de expresia genică (gena p53 și MSH1 și MLH2)

-		t	p	+		t	p	++		t	p
p53	MSH1 MLH2			p53	MSH1 MLH2			p53	MSH1 MLH2		
2,4 ± 1,6	54,8 ± 5,4	6,5	***	16,7 ± 4,1	26,2 ± 4,8	1,1	*	61,9 ± 7,5	19,0 ± 4,3	4,7	***

\*- $p > 0,05$ ; \*\*- $p < 0,05$ ; \*\*\*- $p < 0,01$ .

pentru genele **MLH1** și **MSH2**. Rezultatele obținute în cadrul experienței noastre denotă că, genele menționate se manifestă printr-o activitate transcripțională specifică.

Astfel, în urma reacției RT-PCR pe baza ARN-lui izolat din materialul biologic, s-au constatat 54,8 ±5,4% cazuri ( $p < 0.01$ ) cu expresie negativă, rezultat pozitiv la S.Lynch de gradul I (+) a fost determinat în 26,2 ±4,8% cazuri ( $p < 0.005$ ) și gradul II (++) în 19,0 ±4,3% ( $p < 0.005$ ) (tab. 3).

Studiul comparativ al frecvenței **genelor p53 și MSH1 și MLH2** din lotul studiat îl prezentăm în (tab.4).

Analiza comparativă a rezultatelor primite la bolnavii investigați referitor la **genele p53 (oncogena) și MSH1 și MLH2 (mismatch repair genes-Sindromul Lynch)**, ne-a dat posibilitatea să stabilim că, frecvența cazurilor cu expresie negativă în lotul **MSH1 și MLH2** este de 23 ori mai înaltă, decât în lotul pacienților purtători de gena **p53**- (54,8±5,4% și 2,4±1,6% respective,  $p < 0.01$ ). Rezultatul pozitiv cu expresie de gradul II este de 3 ori mai înalt în lotul pacienților cu p53, față de lotul **MSH1 și MLH2**, fapt demonstrat în tab. E.

Aplicarea reacției RT-PCR (cantitativă) cu utilizarea primerilor specifici, nominalizați anterior, a permis diferențierea genelor implicate în procesul de tumorigeneză. Astfel, în studierea genelor **MSH1 și MLH2** la o parte dintre persoanele, luate în cercetare, expresia genei respective, a avut un aspect foarte bine pronunțat. La alte persoane manifestare moderată, slabă sau lipsă de expresie. La unele dintre persoanele purtătoare de

APC mutantă, s-a constatat o asociere cu instabilitatea secvențelor minisatelitice a genelor mismatch detectate cu ajutorul primerului BAT25.

### Concluzii

1. Rezultatele studiului efectuat au stabilit o expresie diferențiată, în raport cu datele obținute la examenul patomorfologic (acumularea celulelor canceroase în materialul primar). În urma studiului efectuat, am constatat prezența simultană a celulelor modificate, ce se află la diferite stadii de cancerogeneză; prezența simultană a celulelor în stadiul precoce și tardiv - fenomen datorat acțiunii variate a genelor implicate în mecanismul de declanșare a tumorigenezei.

2. Deși, uneori, am observat cazuri de omogenitate, adică o expresie în ansamblu a genelor menționate, totuși, expresia comparativă a genelor specifice pentru adenomii ereditari și sindromul ereditar Lynch MLH1, MSH2, de regulă, a fost diferită una față de alta.

3. Tehnica RT-PCR, utilizată în studiul nostru experimental contribuie la creșterea eficienței consultului medico-genetic, prin asigurarea tratamentului precoce a cancerului colorectal, deja la etapele incipiente de dezvoltare. Manifestarea variabilă a genelor implicate în secvența polip-cancer a constituit momentul-cheie informațional în diagnosticul și tratamentul pacienților cu NECR, la diferite etape de tumorigeneză.

### Bibliografie

- Young J, Leggett B, Gustafson C, Ward M, Searle J, Thomas L, Buttenshaw R, Chenevix-Trench G: Genomic instability occurs in colorectal carcinomas but not in adenomas. *Hum Mutat* 1993, 2:351-354
- Wu BP, Zhang YL, Zhou DY, Gao CF, Lai ZS: Microsatellite instability, MMR gene, expression, and proliferation kinetics in colorectal cancer with familial predisposition. *World J Gastroenterol*. 2000;6:902-905;
- Herrera L, Kakati S, Gibas L, et al: Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am J Med Genet* 25:473, 1986
- Cromwell DM, Moore RD, Bresinger JD, et al: Cost analysis of the alternative approaches to colorectal screening in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 114:893, 1998;
- Stryker SJ, Wolff BG, Culp CE., et al: Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology* 93:1009, 1987
- Magliate DT, Keller KJ, Miller RE, et al: Colon and rectal carcinoma: spatial distribution and detection. *Radiology* 1993;147:669. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, et al: Incidents of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 338:1448, 1998;
- Lynch HT, Smyrk T: Hereditary nonpolyposis colon cancers (Lynch syndrome): an up-date review. *Cancer* 78:114, 1996
- Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, Järvinen HJ: Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *Int J Cancer* 1995, 64:430-433
- Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Muraoka M, Onda A, Okumura Y, Kishi N, Iwama T, Mori T, Koike M, Ushio K, Chiba M, Nomizu S, Konishi F, Utsunomiya J, Miyaki M: Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology* 1996, 111:307-317
- Järvinen H, Mecklin J-P, Sistonen P: Screening reduces colorectal cancer rate in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 1995, 108:1405-1411
- Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Wayne JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF, Ackroyd F, Shike M, Kurtz RC, Hornsby-Lewis L, Gerdes H, Stewart ET: Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993, 329:1977-1981
- Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994;368:258-261.