

АНАЛИЗ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФОРМ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПО ЧЕТЫРЕМ МУТАЦИЯМ ГЕНА *BRCA1* В КАБАРДИНО-БАЛКАРСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

Пардилова С.А.¹, Жантуева Л.А.¹, Канцалиев А.Л.², Пирмагомедов А.Ш.²,
Даурова Л.В.¹, Боготова З.И.¹, Биттуева М.М.¹, Паритов А.Ю.¹, Хандохов Т.Х.¹,
Гидова Э.М.¹, Ситников М.Н.¹

¹ГОУ ВПО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова», Нальчик, e-mail: super.daniel07541@yandex.ru;

²ГУЗ «Онкологический диспансер», Нальчик, e-mail: onko-kbr@yandex.ru

Проведено генотипирование больных раком молочной железы и здоровых женщин в Кабардино-Балкарской Республике, а также анализ ситуации заболеваемости РМЖ в Кабардино-Балкарии за последние пять лет. Собран клинический материал и выделена ДНК более 400 человек (контрольная и опытная группы). Изучена частота встречаемости четырех мутаций 5382insC, 4154delC, 185delAG и Cys61Gly гена *BRCA1* у больных раком молочной железы и в контрольной группе. Изучена взаимосвязь проанализированных мутаций с клиническим проявлением рака молочной железы. Оценка частот распространения мутаций в генах *BRCA1* позволяет проводить ДНК-диагностику рака молочной железы у женского населения нашего региона, что в дальнейшем позволит создать реальную основу для индивидуального и группового прогнозирования рисков развития рака молочной железы в условиях наследственной предрасположенности, а также выявить особенности варьирования генов, вовлеченных в канцерогенез, характерные для популяции Кабардино-Балкарии.

Ключевые слова: рак молочной железы, ген *BRCA1*, 5382insC, 4154delC, 185delAG, Cys61Gly, генетическая предрасположенность, Кабардино-Балкарская Республика.

ANALYSIS OF HEREDITARY BREAST CANCERS, FOUR MUTATIONS OF THE GENE *BRCA1* IN THE KABARDINO-BALKAR REPUBLIC

Pardilova S.A.¹, Zhantueva L.A.¹, Kantsaliev A.L.², Pirmagomedov A.Sh.²,
Daurova L.V.¹, Bogotova Z.I.¹, Bittueva M.M.¹, Paritov A.Yu.¹, Handohov T.H.¹,
Gidova E.M.¹, Sitnikov M.N.¹

¹Kabardino-Balkarian State University n.a. H. M. Berbekov, Nalchik, e-mail: super.daniel07541@yandex.ru;

²GBUZ "Oncological clinic", Nalchik, e-mail: onko-kbr@yandex.ru

Conducted genotyping of patients with breast cancer and healthy women in the Kabardino-Balkar Republic, as well as analysis of the situation of the incidence of breast cancer in Kabardino-Balkaria over the past five years. Collected clinical material selected and the DNA of more than 400 people (the control and experimental groups). Studied the frequency of four mutations 5382insC, 4154delC, Cys61Gly 185delAG and *BRCA1* gene in patients with breast cancer and in the control group. Studied the relationship of analysed mutations with clinical manifestation of breast cancer. Evaluation of the frequency distribution of mutations in the genes *BRCA1* allows DNA diagnosis of breast cancer in the female population of our region, which will allow you to create a real basis for individual and group risk prediction of breast cancer in terms of genetic predisposition and to identify features of variation in genes involved in the carcinogenesis characteristic of the population of Kabardino-Balkaria.

Keywords: Breast cancer, gene *BRCA1*, 5382insC, 4154delC, 185delAG, Cys61Gly, genetic predisposition, Kabardino-Balkaria.

Рак молочной железы является одной из немногих форм опухолей, отличающихся истинным и быстро прогрессирующим ростом заболеваемости. Разнообразие течения заболевания, связь его с некоторыми традициями и обычаями населения, особенностями половой и детородной функции, поражение женщин в наиболее трудоспособном возрасте, а также отсутствие действенных профилактических мер делают проблему рака молочной железы одной из наиболее важных и актуальных проблем современной онкологии. За

последнее десятилетие по России отмечается значительный рост заболевания раком молочной железы - на 30,35%. Так, на 2005 г. было выявлено 297,0 случаев на 100 тыс. населения, а в 2015 г. - 426,4. Рост данного показателя обусловлен как ростом заболеваемости и выявляемости, так и увеличением выживаемости онкологических больных [3].

На сегодняшний день картирован и клонирован целый ряд генов, вовлеченных в канцерогенез, эти гены являются и хранителями клеточного цикла, и генами общего контроля. Доказано, что мутации или структурные изменения, нарушающие функцию генов, поддерживающих стабильность генома, прямо или косвенно участвующих в репарации повреждений ДНК, предрасполагают к возникновению опухоли [5; 7]. В последнее время расширяются исследования, связанные с поиском и характеристикой полиморфных вариантов ДНК в кодирующих и некодирующих районах генов, в той или иной степени вовлеченных в канцерогенез [1; 2].

Установлен аутосомно-доминантный тип наследования рака молочной железы в семьях с высоким риском [4; 6]. Наследственная форма РМЖ чаще диагностируется у молодых женщин репродуктивного возраста. Молекулярные исследования показали, что наследственный РМЖ у молодых женщин этиологически связан с генами *BRCA1* и *BRCA2* [9]. Необходимо отметить, что спектр и частота мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* сильно варьирует в разных популяциях в различных регионах.

Одним из наиболее значимых аспектов генетического консультирования является выявление наследственной предрасположенности к онкологическим заболеваниям. Тестирование клинически значимых мутаций позволяет формировать группы повышенного канцерогенного риска с последующим профилактическим обследованием и диспансерным наблюдением лиц, которые имеют наследственную предрасположенность к злокачественным новообразованиям.

В связи этим целью настоящего исследования стало изучение 4 мутаций гена *BRCA1* и их роли в заболеваемости раком молочной железы женщин Кабардино-Балкарии.

Материалы и методы исследования

Для проведения популяционного исследования сбор образцов крови жителей КБР, больных РМЖ, осуществляется среди пациентов, находившихся на стационарном лечении в ГУЗ «Онкологический диспансер» с 2009 по 2015 г. Данные о каждом участнике эксперимента были собраны путем опроса и занесены в специально разработанную формализованную карту – анкету. При обработке информации учитывались сведения о пациентах, включающие возраст, национальность, возраст манифестации, наличие в семье случаев онкопатологии, стадию заболевания, локализацию и морфологические

характеристики опухоли, возраст менархе, наличие детей, связь работы с вредными факторами среды, стаж курения или его отсутствие. Исследование проводилось на основании письменного согласия всех участников.

Общая выборка составляет около 400 человек, в том числе $n = 200$ проб здоровых лиц (контрольная группа), $n = 200$ – больных РМЖ. Возраст женщин, участвовавших в данном исследовании, колебался от 19 до 79 лет.

Лабораторные исследования выполнены на базе Медико-биологического центра КБГУ. Исследуемым материалом для исследования служила венозная периферическая кровь. Забор клинического материала проводили для исключения контаминации с помощью стерильных, одноразовых пробирок Vacutest КЗ ЭДТА объемом 9 мл. Выделение ДНК проводилось из лимфоцитов периферической венозной крови вручную с помощью набора QIAmp DNA blood Mini Kit (производитель Qiagen, Германия).

При проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) был использован набор реагентов для проведения аллель-специфичной полимеразной реакции ООО НПФ «Литех» (г. Москва).

Аmplицированный специфический фрагмент выявляли электрофоретическим методом в 3%-ном агарозном геле толщиной 6-7 мм в присутствии бромистого этидия. Электрофорез проводился в горизонтальном аппарате для электрофореза Mini-Sub Cell GT при 150 В в течение 15-20 мин. Данные анализировали с помощью аналитической системы «БиоДок-Ит М-26Х» при облучении геля УФ-излучением с длиной волны 290-330 нм.

Результаты и обсуждения

Анализ показателей заболеваемости раком молочной железы в КБР

В России, как и в большинстве стран мира, растет заболеваемость злокачественными новообразованиями.

В Кабардино-Балкарии с 2011 по 2015 год отмечается рост заболеваемости злокачественными новообразованиями на 13,8%, показатель заболеваемости на 100 тыс. населения составил на 2011 г. – 228,6, в 2015 г. – 265,1 (в РФ – 2029,0 и 2329,8, соответственно) [3]. Число вновь зарегистрированных случаев в КБР с 2011 по 2015 г. выросло на 268 (рис. 1).



Рис. 1. Заболеваемость злокачественными новообразованиями в Кабардино-Балкарии

В структуре онкологической заболеваемости в КБР на 2015 год на первом месте рак кожи 12,94%, на втором – рак молочной железы – 12,85%, на третьем месте – рак легкого – 11,8%, на четвертом месте – рак простаты – 5,04%, на пятом месте – рак шейки матки – 3,77%.

По данным на 2015 год, в Северо-Кавказском ФО наблюдается увеличение выявленных случаев развития РМЖ [3] (таблица).

Показатели диагностики рака молочной железы, выявленного в 2015 г. в СКФО

Республика, край, область	ЗНО*	Из них						Летальность на первом году с момента уст. диагноза, %
		Диагноз подтвержден, %	Имели стадию заболевания, %					
			1	2	3	4	Не установлена	
Северо-Кавказский ФО	2998	97,1	13,3	45,4	29,7	10,6	1,0	7,5
Ставропольский край	1290	96,5	16,9	40,3	33,1	8,9	0,8	7,7
Республика Ингушетия	109	95,4	10,1	25,7	29,4	34,9	0,0	12,4
Республика Дагестан	542	98,5	8,9	52,8	29,7	8,3	0,4	6,7
Кабардино-Балкария	293	91,5	16,4	45,1	24,9	9,6	4,1	7,1

Северная Осетия	324	99,4	6,2	55,2	32,4	6,2	0,0	9,7
Карачаево-Черкесия	193	99,3	7,2	54,0	25,9	8,6	4,3	7,7
Республика Чечня	301	100,0	15,0	46,8	18,3	19,9	0,0	4,3

*ЗНО – зарегистрировано новообразований (без учтенных посмертно).

По данным ГУЗ «Онкологический диспансер», наблюдается незначительное снижение частоты случаев заболевания раком молочной железы с 2014 по 2015 г. по КБР (на 100 тыс. населения – 64,2 и 64,0 соответственно). Но можно отметить, что в некоторых районах республики в 2015 году выявлен значительный рост случаев РМЖ по сравнению с предыдущим годом (Майский и Прохладненский районы). Отмечено значительное уменьшение случаев заболеваемости в Баксанском, Зольском и Лескенском районах (рис. 2).



Рис. 2. Заболеваемость раком молочной железы в Кабардино-Балкарии за 2014-2015 гг.

Таким образом, в Кабардино-Балкарской Республике наблюдается повышение случаев онкопатологий за последние 5 лет на 13,8% (по РФ – 12,9% соответственно). Не наблюдается ни значительного роста, ни спада случаев РМЖ в 2015 году по КБР.

Выявление причин заболеваемости, смертности, спада и роста случаев РМЖ достаточно трудная задача. Отмеченный за последние 10 лет рост случаев заболеваемости РМЖ в России и большинстве стран мира, вероятно, можно связать не только с ростом самой заболеваемости данной патологией, но и с возросшим уровнем ранней диагностики среди женского населения, без симптомов РМЖ. В разных странах причины роста заболеваемости РМЖ могут отличаться, и это объясняется не только скринингом или улучшением регистрации впервые заболевших и учетом умерших, но и рядом других факторов [9]. В

связи с этим для снижения показателей впервые выявленных запущенных форм злокачественных новообразований необходимо усилить онконастороженность врачей общей лечебной сети, а также продолжить работу по улучшению качества диагностики и лечения, увеличению охвата населения профилактическими медицинскими осмотрами и диспансеризацией.

Индивидуальные данные об условиях и образе жизни участников эксперимента

Работа выполнена на базе Медико-биологического центра КБГУ с целью получения и анализа результатов ПЦР-генотипирования больных раком молочной железы и здоровых лиц (контрольной группы) в возрасте от 20 до 79 лет.

Поскольку существует специфичность в распределении мутаций и полиморфных вариантов разных генов у разных народов, в генетических исследованиях различных заболеваний следует учитывать этническое происхождение группы больных и контроля. В ходе исследования уточнялись данные об этнической принадлежности пациенток путем опроса и выяснения национальной принадлежности родителей до третьего поколения.

По возрастному составу контрольная и опытная группа несколько отличались. В контрольной группе возраст женщин колебался от 20 до 69 лет (средний возраст 31,7 года) (рис. 3), а в группе больных РМЖ от 25 до 79 лет (средний возраст 51 год) (рис. 4).

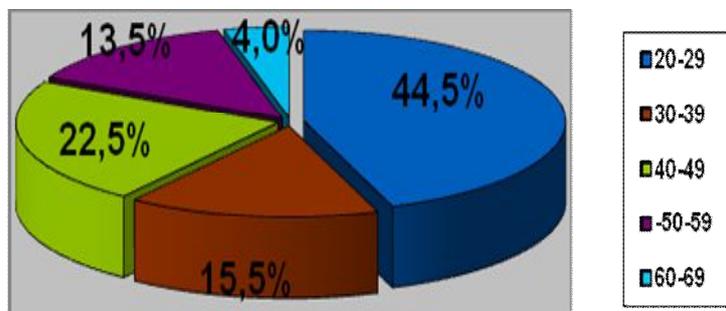


Рис. 3. Возрастной состав контрольной группы

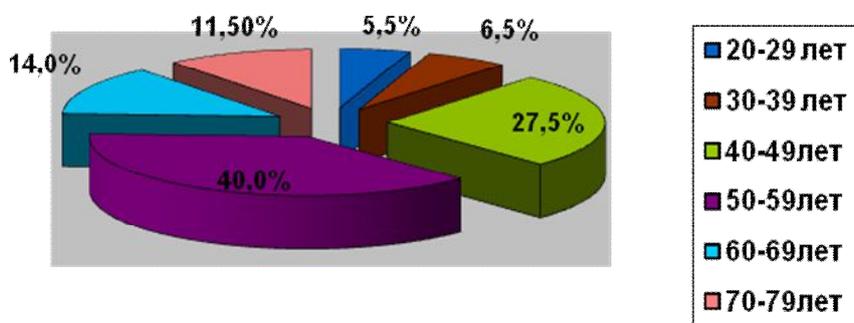


Рис. 4. Возрастной состав обследованных больных РМЖ

Таким образом, при распределении больных по возрасту возникновения и развития РМЖ пик манифестации заболевания отмечается в возрасте от 50 до 59 лет, что составило 40% от всей выборки больных.

Изучение мутаций в генах BRCA 1 у больных раком молочной железы

Биохимические, генетические и цитологические исследования указывают на огромную роль *BRCA1* в регуляции транскрипции, репарации ДНК и апоптозе. Доля *BRCA1* – ассоциированного РМЖ составляет 45%.

В исследовании проведен анализ распространения мутаций 5382insC, 4154delC, 185delAG, Cys61Gly в гене *BRCA1*.

Мутация, связанная с инсерцией цитозина в позиции 5382 гена *BRCA1*, обнаружена у 4,5% (9 человек из 200) из числа лиц больных РМЖ в КБР, для которых характерен более ранний возраст манифестации заболевания. В России наиболее частой является мутация 5382insC – более 80% всех мутаций гена. Среди контрольной группы изучаемая мутация не выявлена.

Мутация, связанная с делецией цитозина 4154 гена *BRCA1*, обнаружена у 0,5% (1 человек из 200) из числа лиц больных РМЖ по КБР. Среди контрольной группы изучаемая мутация не выявлена.

В результате генотипирования больных раком молочной железы и здоровых лиц мутации 185delAG, Cys61Gly в гене *BRCA1* не были выявлены.

Поиск исследуемых мутаций будет продолжен у жительниц Кабардино-Балкарии по мере увеличения исследуемой выборки.

Заключение

В связи с тем что спектр частот мутаций весьма специфичен в разных популяциях, предлагается проведение систематических ассоциативных исследований полиморфизма генов, связанных с риском развития рака молочной железы у жительниц Кабардино-Балкарии. Выявленная с наибольшей частотой мутация 5382insC в гене *BRCA1* позволяет осуществить скрининг в группах повышенного риска и у женщин с неотягощенным семейным анамнезом для проведения своевременной профилактики возникновения и развития РМЖ. Полученные результаты позволят впервые создать реальную основу для индивидуального и группового прогнозирования рисков развития рака молочной железы в условиях наследственной предрасположенности, а также выявить особенности варьирования генов, вовлеченных в канцерогенез, характерные для популяции Кабардино-Балкарии.

Список литературы

1. Залетаев Д.В., Горбунова В.Н., Бабенко О.В. Онкогеномика и молекулярная диагностика в онкологии. – М., 2001.
2. Карпухин А.В., Логинова А.Н., Хомич Е.В., Поспехова Н.И. Наследственная предрасположенность к раку молочной железы // Медицинская генетика. 2002. - Т. 1. - № 6. - С. 254-259.
3. Состояние онкологической помощи населению России в 2015 году / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М. : МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2016. - 236 с. – илл. ISBN 978-5-85502-226-1 Москва, 2016.
4. Antoniou A.C. and Easton D.F. Models of genetic susceptibility to breast cancer // Oncogene. 2006. - Vol. 25. - P. 5898-5905.
5. Buslov K.B., Iyevleva A.G., Chekmariova E.V. et al. NBS1 657del5 mutation may contribute only to a limited fraction of breast cancer cases in Russia // Int. J. Cancer. - 2004. - Vol. 114. - P. 585-589.
6. Pharoah P.D., Antoniou A., Bobrow M. et al. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention // Nat. Genet. - 2002. - Vol. 31. - P. 33-36.
7. Rebbeck T.R. The contribution of inherited genotype to breast cancer // Breast Cancer Res. 2002. - Vol. 4. - P. 85-89.
8. Walsh T., Casadei S., Coats K.H. et al. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in families at high risk of breast cancer // JAMA. - 2006. - Vol. 295. - P. 1379-1388.
9. Oncology.ru («онкология») : электронное периодическое издание: специализированный онкологический ресурс. - М. 27.12.1991. - URL: <http://www.oncology.ru/specialist/epidemiology/malignant/C50/> (дата обращения: 12.05.16).