

ГЕРМИНАЛЬНЫЕ МУТАЦИИ В ГЕНАХ *BRCA1* И *BRCA2* У ПАЦИЕНТОК ЮГА РОССИИ С КЛИНИЧЕСКИМИ ПРИЗНАКАМИ НАСЛЕДСТВЕННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Богомолова О.А., Шатова Ю.С., Верескунова М.И., Черникова Е.Н., Кучкина Л.П., Луганская Р.Г., Бакулина С.М., Водолажский Д.И.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону-е-mail: olia_bogomolova20@mail.ru

Генетическая предрасположенность является одним из главных факторов развития рака молочной железы, на долю которого приходится от 5 до 10 % случаев этого заболевания. В 30 % наследственные формы рака молочной железы ассоциированы с наличием мутаций в генах *BRCA1/2*, относящихся к сложному комплексу системы репарации ДНК. Нами были изучены спектр и частота встречаемости герминальных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у 133 пациенток с клиническими признаками наследственного рака молочной железы, постоянно проживающих на территории Южного Федерального Округа. Суммарная частота мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* составила 14,2 % от общего числа обследованных пациенток. Было выявлено два типа мутаций: 16 образцов (12 %) несли мутацию 5382 insC в 20 экзоне гена *BRCA1* и 3 образца (2,2 %) содержали мутацию 300T>G в этом же гене. Генетических изменений в гене *BRCA2* не было выявлено. Проведенная работа свидетельствует об адекватности использования данной панели маркеров для пациентов ЮФО, не исключая возможности ее расширения.

Ключевые слова: наследственный рак молочной железы, гены *BRCA1*, *BRCA2*.

GERMINAL MUTATIONS IN *BRCA1* AND *BRCA2* IN PATIENTS OF THE SOUTH OF RUSSIA WITH CLINICAL SIGNS OF HEREDITARY BREAST CANCER

Bogomolova O.A., Shatova Yu.S., Vereskunova M.I., Chernikova E.N., Kuchkina L.P., Luganskaya R.G., Bakulina S.M., Vodolazhsky D.I.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: olia_bogomolova20@mail.ru

Genetic predisposition is one of the main factors of the breast cancer development, with the morbidity 5–10 % of cases. In 30 %, hereditary breast cancer is associated with mutations in the *BRCA1/2* genes related to a complex of the DNA repair system. We studied the spectrum and incidence of germinal mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes in 133 patients in the Southern Federal District with clinical signs of hereditary breast cancer. The total mutation rate in the *BRCA1* and *BRCA2* genes in all patients was 14.2 %. We observed two types of mutations: 16 samples (12%) with the 5382 insC mutation in exon 20 of the *BRCA1* gene and 3 samples (2.2 %) with the 300T>G mutation in the same gene. Genetic changes in the *BRCA2* gene were not found. The study demonstrated the advisability of the use of this panel of markers, with its possible expansion, for patients of the Southern Federal District.

Keywords: hereditary breast cancer, *BRCA1* and *BRCA2* genes.

На сегодняшний день рак молочной железы (PMЖ) по-прежнему занимает лидирующие позиции среди онкологических патологий у женщин в мире [1].

Генетическая предрасположенность является одним из главных факторов риска развития данного заболевания, на долю которого приходится от 5 до 10 % случаев всех злокачественных новообразований данной локализации [2].

В основе развития семейных форм PMЖ лежат наследственные мутации в генах *BRCA 1/2*, *CHEK2*, *TP53*, *NBN*, *PALB2* и др. Однако около 30 % из всех наследственных случаев обусловлено мутациями в генах *BRCA* (Breast Cancer Associated) 1 и *BRCA2*. Эти гены относятся к высоко пенетрантным, функцией которых является участие в поддержании

целостности генома и обеспечении репарации двойных разрывов ДНК, возникающих при воздействии различных повреждающих факторов [3].

Женщины, несущие наследственные мутации в гене BRCA1, имеют риск развития РМЖ 45–60 % в возрасте до 40 лет. В свою очередь, при наличии мутаций в гене BRCA2, риск РМЖ составляет 25–40 % [4]. Среди здоровых лиц можно выделить группу носителей мутаций, у которых онкологическая патология разовьется с высокой вероятностью в течение жизни. Также известно, что риск развития рака в контрлатеральной молочной железе в случае обнаружения мутантного типа гена BRCA в возрасте 41–50 лет составляет 6,3 %, в то время как среди больных старше 60 лет риск развития контрлатерального РМЖ равен нулю [4]. Генетически обусловленные формы РМЖ, в отличие от спорадических, имеют свои особенности течения и прогноза и требуют индивидуального подхода как в диагностике, так и в профилактике данного заболевания.

Международная база данных (Breast Cancer Information Core) содержит свыше 300 различных вариантов мутаций генов BRCA 1/2. Несмотря на то, что мутации генов BRCA1/2 чрезвычайно многообразны, при обследовании населения в разных странах часто можно проследить т.н. «эффект основателя» (foundereffect), заключающийся в преобладании каких-либо конкретных мутаций BRCA1/2 в данной популяции (табл.1). Так, повышенная частота мутаций BRCA1 185delAG, BRCA1 5382insC и BRCA2 6174delT характерна для евреев Ашкенази – на эти три мутации приходится 98–99 % всех мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 [5]. В Италии из всех обнаруженных мутаций в гене BRCA1 мутации BRCA1 3347delAG, BRCA1 3404delA, BRCA1 1499insA, BRCA1 5181delGTT составляют более 73 % [6]. Для Норвегии характерны мутации в гене BRCA1 1675delA, 3347delAG, 816delGT и 1135insA, на которые приходится свыше 68 % всех обнаруженных мутаций [7]. В Исландии практически единственной мутацией является 999del5 гена BRCA2 [8]. В странах Восточной Европы более чем в 70 % случаев выявляются мутации BRCA1 5382insC, BRCA1 4154delA и BRCA1 T300G [9-12].

Таблица 1

Спектр преобладающих мутаций в разных странах

Страна	Преобладающая мутация
Австрия	<i>BRCA1</i> 300T>G (C61G)
Италия	<i>BRCA1</i> 3404delA, <i>BRCA1</i> 3347delAG
Германия	<i>BRCA1</i> 4184del4, <i>BRCA1</i> 2457C> T
Греция	<i>BRCA1</i> 5331G> A, <i>BRCA1</i> 15370C> T
Норвегия	<i>BRCA1</i> 1675delA, <i>BRCA1</i> 3347delAG
Финляндия	<i>BRCA1</i> 4216-2A> G, <i>BRCA2</i> 999del5

Согласно ряду российских исследований преобладающими мутациями на территории Российской Федерации являются: 5382insC, C61G, 185delAG, 4154delA, 2080delA, 6174delT, которые охватывают до 70–90 % всего спектра выявленных мутаций в этих генах. Однако большое количество работ доказывают тот факт, что спектр мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 различается от региона к региону [13, 14, 15].

Влияние генетической предрасположенности к РМЖ у женщин в Южном Федеральном Округе изучено недостаточно, таким образом, целью нашей работы стало выявление спектра и частот встречаемости мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 в популяциях ЮФО среди пациенток с клиническими признаками наследственного рака молочной железы.

Материалы и методы

Нами был проведен молекулярно-генетический анализ ДНК 133 пациенток с верифицированным РМЖ и клиническими признаками наследственного РМЖ, проходивших стационарное лечение в ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» (РНИОИ) Минздрава Российской Федерации, постоянно проживающих в ЮФО. Медиана возраста на момент постановки диагноза составляла 49 лет, а возраст варьировал в диапазоне от 24 до 79 лет.

При отборе пациенток для включения в исследование учитывались следующие клинические признаки [2,13]:

- молодой возраст начала заболевания (до 50 лет);
- онкологически отягощенный семейный анамнез;
- наличие первично-множественных опухолей;
- трипл-негативный статус рецепторов ER, PR, Her2.

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью лизирующего SDS-содержащего буфера в присутствии протеиназы-К и последующей фенол-хлороформной экстракции. Концентрацию полученных препаратов ДНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0® (Invitrogen, США) с использованием набора Quant-iT™ dsDNA (HS) AssayKit (Invitrogen, США) и доводили до 2 нг/мкл. Постановку реакции ПЦР-амплификации проводили с помощью комплекта реагентов «BRCA-скрин» (ИнтерЛабСервис, Россия), предназначенного для определения 6 мутаций в генах BRCA1/2 (табл. 2) согласно протоколу производителя на термоциклере MaxygeneGradient (Axygen). Для идентификации ПЦР-продуктов использовали метод электрофореза в 2 % агарозном геле и систему геледокументирования GelDoc XR PLUS (BioRad, USA). В дальнейшем продукт амплификации

подвергали очистке, денатурации и отмывке при помощи станции для пробоподготовки (VacuumPrepWorkstation, Qiagen, Germany). Затем одноцепочечный ПЦР-продукт отжигали с секвенирующими праймерами при 80 °С и использовали для проведения реакции пиросеквенирования в системе генетического анализа PyroMark Q24 (Qiagen, Germany). Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения PyroMark Q24 Software (Qiagen, Germany).

Таблица 2

Спектр анализируемых мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 с использованием набора реагентов "BRCA-скрин" («ИнтерЛабСервис», Россия):

Локус	Полиморфизм	Последовательность нуклеотидов для анализа
<i>BRCA1</i>	185delAG	TCTAAGATTTTC
<i>BRCA1</i>	300T>G (C61G)	T/GGTCCTTTA
<i>BRCA1</i>	2080delA	TCTTTATC
<i>BRCA1</i>	4154delA	GAAGAAAGAGGA
<i>BRCA1</i>	5382insC	GATTCTCTTG
<i>BRCA2</i>	6174delT	ACTTGCTGT

Результаты и обсуждение

В ходе проведения молекулярно-генетического исследования 133 образца геномной ДНК выделенной из лейкоцитов периферической крови пациенток с клиническими признаками наследственного рака молочной железы были выявлены 19 образцов, несущих мутацию в исследованных генах, что составило 14,2 % (рис.1).

Из всего проанализированного спектра было выявлено два типа мутаций: 16 образцов несли мутацию 5382 insC в 20 экзоне гена BRCA1 и 3 образца содержали мутацию 300T>G в этом же гене. Генетических изменений в гене BRCA2, в рамках нашего исследования, не было выявлено.

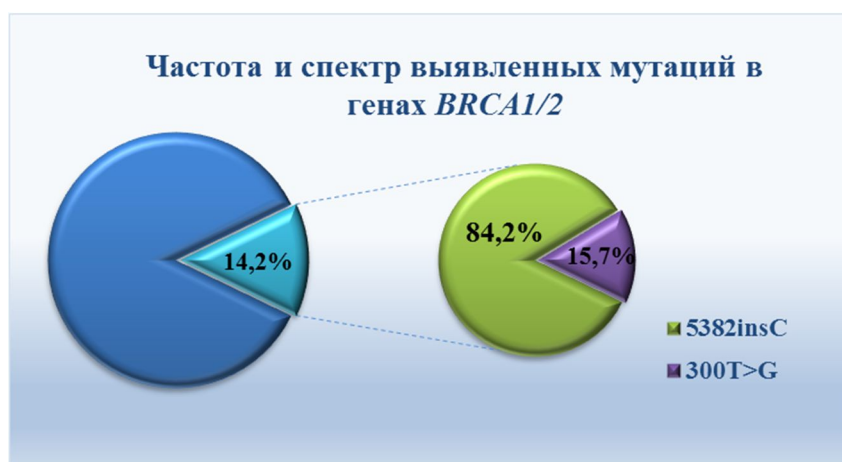


Рис. 1. Частота и спектр мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*

Для пациенток, несущих мутации, были характерны инфильтрирующий протоковый, медулярный, билатеральный и криброзный раки. По гистологическим заключениям преобладала инфильтрирующая карцинома. Трижды негативный подтип РМЖ среди пациенток, имеющих мутации 5382 insC в гене *BRCA1*, был выявлен в двух случаях или в 12,5 % случаев от всех мутаций 5382 insC в гене *BRCA1*. Люминальный тип В наблюдался в 3 случаях (18,75 %), Her2-положительными были 2 пациента (12,5 %), а люминальный А подтип встретился только 1 раз (6,25 %).

При анализе семейного онкологического анамнеза РМЖ был отмечен у 14 кровных родственников по материнской линии (76,9 %), у четырех пациенток с мутациями в гене *BRCA1* 5382 insC, в семейном анамнезе онкозаболеваний отмечено не было (23,1 %). Таким образом, можно сделать вывод, что сбор анамнеза о случаях онкологических заболеваний в семье не является достаточным и единственным критерием отбора при назначении молекулярно-генетического тестирования мутаций генов *BRCA1/2*.

В проведенном нами исследовании также была обнаружена мутация 300T>G в гене *BRCA1* с частотой встречаемости данного типа мутаций 15,7 %. При гистологическом исследовании, так же, как и при наличии мутаций 5382insC в гене *BRCA1* была отмечена инфильтрирующая протоковая карцинома. Возраст пациенток на момент постановки диагноза составлял 30, 48 и 60 лет. Семейный анамнез также был отягощен.

При оценке роли клинических составляющих наследственного РМЖ обнаружено, что у 10-ти пациенток (в 52,6 %) с сочетанием двух признаков наследственного РМЖ во всех случаях присутствовали мутации в гене *BRCA1*. У четырех пациенток с мутацией 5382 insC (21,1 %) в гене *BRCA1* наблюдалось сочетание трех клинических признаков НРМЖ (молодой возраст манифестации заболевания, онкологически отягощенный анамнез и синхронный или метакронный рак). Одна пациентка (5,2 %), носительница мутантного

аллеля, имела в личном анамнезе рак яичников. И четыре пациентки (21,05 %) имели лишь один из перечисленных признаков наследственного рака молочной железы.

Анализ распределения мутаций в зависимости от возраста показал (рис. 2), что наиболее часто мутации в гене BRCA1 манифестируются у пациенток в возрасте от 30–39 лет – 57,9 %, в группе 40–49 лет – 26,3 % и в группе старше 50 лет в 15,8 % случаев, что хорошо согласуется с критериями возрастной пенетрантности наследственного РМЖ.

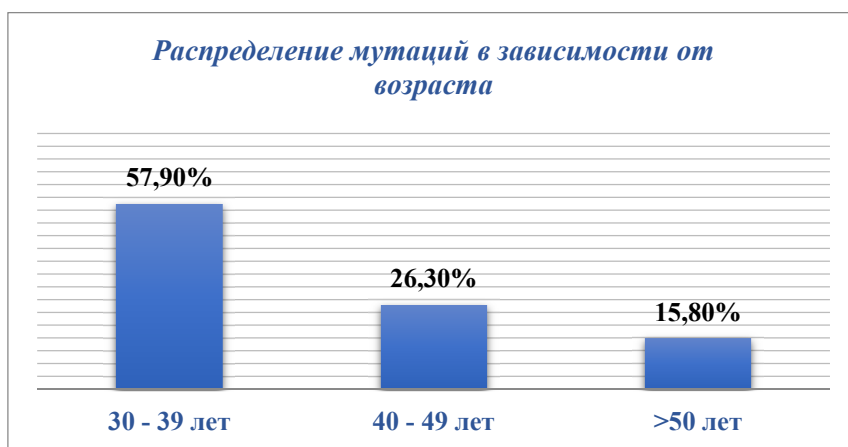


Рис. 2. Встречаемость мутаций гена BRCA1 у пациенток с РМЖ в зависимости от возраста

Заключение

Результаты проведенного нами анализа наглядно демонстрируют качественный спектр и частоту встречаемости мутаций в генах BRCA1 и BRCA2, аналогичную ранее проведенным исследованиям на территории Российской Федерации у пациенток славянской группы [12]. Это позволяет сделать вывод, что используемая нами диагностическая панель инструментов может быть корректно использована для скрининга «классических» наследственных полиморфизмов в генах BRCA1/2 у пациенток Юга России, среди которых представители славянской группы составляют подавляющее большинство.

Список литературы

1. Злокачественные новообразования в России в 2012 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2014. – 12 с.
2. Любченко Л.Н. Наследственный рак молочной железы и/или яичников: ДНК-диагностика, индивидуальный прогноз, лечение и профилактика: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Москва, 2009. – 50 с.

3. Киселев В.И., Мужнейк Е.Л. Наследственный рак и современные возможности лекарственной коррекции генетических дефектов /В.И. Киселев, Е.Л. Мужнейк. – М., 2011. – С. 1-16.
4. Phelan C.M., Kwan E., Jack E. et al. A low frequency of non-founder BRCA1 mutations in Ashkenazi Jewish breast-ovarian cancer families // Hum. Mutat. – 2002. – V. 20 (5). – P. 352–357.
5. Papi L., Putignano A.L, Congregati C. et al. Founder mutations account for the majority of BRCA1-attributable hereditary breast/ovarian cancer cases in a population from Tuscany, Central Italy // Breast Cancer Res. Treat. – 2009. – V. 117 (3). – P. 497–504.
6. Møller P., Heimdal K., Apold J. et al. Genetic epidemiology of BRCA1 mutations in Norway // Eur. J. Cancer. – 2001. – V. 37 (18). – P. 2428–2434.
7. Rafnar T., Benediksdottir K.R., Eldon B.J. et al. BRCA2, but not BRCA1, mutations account for familial ovarian cancer in Iceland: a population-based study // Eur. J. Cancer. – 2004. – V. 40 (18). – P.2788–2793.
8. Górski B., Jakubowska A., Huzarski T. et al. A high proportion of founder BRCA1 mutations in Polish breast cancer families // Int. J. Cancer. – 2004. – V. 110 (5). – P. 683–686.
9. Plakhins g., Irmejs a., Gardovskis a. et al. Genotype-phenotype correlations among brca1 4153delA and 5382insC mutation carriers from Latvia // BMC MEDICAL GENETICS. – 2011. – V. 12. – P. 147.
10. Любченко Л.Н. Генетическое тестирование при наследственном раке молочной железы /Л.Н. Любченко // Практическая онкология. – 2014. – Т.15, № 3. – С. 107-117.
11. Petrucelli N., Daly M.B., Feldman G.L. Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2 // Genet. Med. 2010. Vol. 12 (5). P. 245–259.
12. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы /Е.Н. Имянитов // Практическая онкология. – 2010. – Т.11, № 4. – С. 264.
13. Пржедецкий Ю.В., Водолажский Д.И., Шатова Ю.С., Комова Е.А., Двадненко К.В. BRCA-мутации у больных с клиническими признаками наследственного рака молочной железы в южном федеральном округе /Ю.В. Пржедецкий [и др.] // Злокачественные опухоли. – 2015. – № 4-2 (16). – С. 121-122.
14. Сабиров А.Х., Федоров Н.М., Кудряков А.Ю., Синяков А.Г. Оптимизация диагностики, лечения и диспансеризации больных с наследственно-обусловленным раком молочной железы /А.Х. Сабиров [и др.] // Медицинская наука и образование Урала. – 2012. – №3. – С. 81-83.
15. Биттуева М.М. Анализ наследственных форм рака молочной железы по четырем мутациям гена BRCA1 в Кабардино-Балкарской республике /М.М. Биттуева // Архивариус. – 2016. – №10 (2). – С. 5-6.