

ПОЛИМОРФИЗМ СНЕК2-ГЕНА У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В КАБАРДИНО-БАЛКАРИИ

Биттуева М.М., Боготова З.И., Дзамихова А.З., Шабиханова Э.И., Хандохов Т.Х.

ГОУ ВПО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова», Нальчик, e-mail: madbi@mail.ru

Рак молочной железы (РМЖ) - наиболее часто встречающийся рак у женщин. Вероятность заболеть в течение жизни раком молочной железы составляет около 12%. Примерно 5-10% случаев РМЖ у женщин относятся к семейному раку, когда опухоли возникают сравнительно в молодом возрасте, поражают молочные железы и яичники, и риск развития рака у близких родственников также высок. Частота встречаемости наследственного рака связана с мутациями в генах BRCA1, BRCA2, TP53, PTEN, СНЕК2 и др., составляет 5-10% от всех случаев, включая спорадические формы и наследственные. Изучение взаимосвязи наличия мутаций с риском возникновения РМЖ является актуальным и активно изучаемым направлением в онкологии и онкогенетике. На сегодняшний момент стало возможным исследовать носительство более 2000 мутаций в кодирующих последовательностях генов, связанных с вероятностью возникновения РМЖ, в том числе мутаций в гене СНЕК2 (чекпойнткиназы). Основная роль этого гена - участие в контроле клеточного цикла и репарации повреждений ДНК. Впервые мутации в гене СНЕК2 были обнаружены в работе Bell et al., в которой указывалось на 3 мутационные точки у лиц с наследственным синдромом Ли-Фраумени - это 2 варианта 1100delC и вариант 470T>C (Ile157Thr). С этих исследований началось широкое изучение полиморфизма в этом гене и его связь с предрасположенностью к раку молочной железы. В связи с этим целью данной работы является изучить частоту встречаемости высокопенетрантных мутаций СНЕК2 (1100delC, Ile157Thr) у больных раком молочной железы и здоровых жительниц Кабардино-Балкарии, а также провести анализ клинико-морфологических характеристик исследованных больных РМЖ (изучение семейного анамнеза, возрастной состав, пик манифестации заболевания и размер опухоли).

Ключевые слова: рак молочной железы, герминальные мутации, ген СНЕК2, полиморфизм, наследственная предрасположенность.

CHEK2-GENE POLYMORPHISM IN BREAST CANCER PATIENTS IN KABARDINO-BALKARIA

Bittueva M.M., Bogotova Z.I., Dzamikhova A.Z., Shabikhanova E.I., Khandokhov T.Kh.

Kabardino-Balkarian State University n.a. H.M. Berbekov, Nalchik, e-mail: madbi@mail.ru

Breast cancer (BC) is the most common cancer in women. The chance of getting breast cancer in a lifetime is about 12%. Approximately 5-10% of breast cancer cases in women are familial cancer, when tumors occur at a relatively young age, affect the mammary glands and ovaries, and the risk of developing cancer in close relatives is also high. The frequency of hereditary cancer associated with mutations in the genes BRCA1, BRCA2, TP53, PTEN, СНЕК2, etc., is 5-10% of all cases, including sporadic and hereditary forms. The study of the relationship between the presence of mutations and the risk of breast cancer is a topical and actively studied area in oncology and oncogenetics. To date, it has become possible to investigate the carriage of more than 2000 mutations in the coding sequences of genes associated with the likelihood of breast cancer, including mutations in the СНЕК2 (checkpoint kinase) gene. The main role of this gene is participation in the control of the cell cycle and the repair of DNA damage. For the first time, mutations in the СНЕК2 gene were found in the work of Bell et al., which indicated 3 mutation points in individuals with hereditary Li-Fraumeni syndrome - these are 2 variants 1100delC and a variant 470T>C (Ile157Thr). These studies began a broad study of polymorphism in this gene and its relationship with predisposition to breast cancer. In this regard, the purpose of this work is to study the frequency of occurrence of highly penetrant СНЕК2 mutations (1100delC, Ile157Thr) in breast cancer patients and healthy residents of Kabardino-Balkaria, as well as to analyze the clinical and morphological characteristics of the studied patients with breast cancer (study of family history, age composition, peak disease manifestation and tumor size).

Keywords: breast cancer, germline mutations, СНЕК2 gene, polymorphism, hereditary predisposition.

Генетическими причинами канцерогенеза являются изменения в последовательности ДНК, ведущие к нарушению контроля клеточной пролиферации, механизмов репарации, апоптоза и сигнальной трансдукции. Генетическая нестабильность, вместе с неограниченной клеточной пролиферацией, способствует накоплению в клетках мутаций, необходимых для образования опухоли. Одной из таких предпосылок является ослабление функции чекпойнтов клеточного цикла, в результате которого клетка с поврежденной структурой ДНК и хромосомами продолжает делиться и умножает число своих аномальных потомков. В результате неограниченной клеточной пролиферации, нередко выходящей за пределы своей ткани и способности неопластического клона к росту, возникают злокачественные новообразования различной локализации.

Наиболее распространенным «женским» видом рака является рак молочной железы (РМЖ). По данным ВОЗ, в 2020 году зафиксировано более 2,26 миллиона случаев РМЖ, что составляет 11,7% от всех случаев злокачественных новообразований [1]. Общее число летальных случаев от РМЖ в 2020 году достигло 685,0 тысяч человек (6,9% всех случаев смерти от рака). Уровень смертности от РМЖ уступает только раку легких и злокачественным новообразованиям желудочно-кишечного тракта.

Согласно статистическим данным, ежегодно в России раком молочной железы болеет около 46 тысяч женщин [2]. В Кабардино-Балкарии в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями рак молочной железы занимает лидирующее место. По данным Минздрава Кабардино-Балкарской Республики, по состоянию на 2021 год общее число больных РМЖ - 3381 человек [2].

Большинство видов опухолей человека развивается спорадически, однако на сегодняшний момент известно около 50 наследственных форм рака. Многие гены предрасположенности к раку наследуются согласно законам Менделя. Обычно мутации одного аллеля недостаточно для развития опухоли. Для направления клетки в сторону канцерогенеза нужна по меньшей мере еще и другая соматическая мутация во второй копии гена. Кроме того, для проявления ракового фенотипа клеток обычно требуются дополнительные мутации в других генах.

Мутации и нарушение экспрессии характерны в раковых клетках для двух категорий генов: протоонкогенов и генов-супрессоров опухолевого роста. Причиной возникновения наследственного рака молочной железы являются в том числе и мутации в генах-супрессорах, контролирующих клеточный цикл, процессы апоптоза и репарацию повреждений ДНК. В здоровых клетках гены-супрессоры должны задерживать прохождение клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК или внешние сигналы остановки клеточного роста. В случае мутации или инактивации генов-супрессоров нормальное прохождение

клеткой сверхточных точек (чекпойнтов) нарушается или они теряют способность к апоптозу при значительных повреждениях клеточной ДНК. Это приводит к дальнейшему накоплению мутаций и к постоянному делению клеток без фазы покоя. При инактивации сразу двух аллелей гена-супрессора опухолей и других генетических нарушений, стимулирующих рост и деление клеток, они могут стать канцерогенными.

Определенные высокопенетрантные мутации в генах значительно увеличивают риск развития РМЖ, причем чаще всего здесь задействованы гены BRCA1, BRCA2, TP53, CHEK2, и т.д. На сегодняшний момент известно множество различных мутаций разной степени пенетрантности, которые связаны с риском развития РМЖ, в том числе и мутации в гене CHEK2 (ген чекпойнткиназы) [3].

Потеря контроля над клеточной пролиферацией – основное генетическое нарушение в опухолевых клетках. Рост и дифференцировка клеток находятся под строгим контролем, иначе целостность органов и тканей будет нарушена за счет аномальных типа и количества клеток, входящих в их состав. В регуляцию клеточного цикла, апоптоза и клеточного ответа на внешние сигналы вовлечено множество генных продуктов. В опухолевых клетках многие из контролирующих эти функции генов экспрессируются аномально, что приводит к неконтролируемой клеточной пролиферации.

В ответ на повреждение ДНК и блокировку репликации развитие клеточного цикла останавливается за счет контроля важных регуляторов клеточного цикла. Белок, кодируемый геном CHEK2, является регулятором контрольной точки клеточного цикла и супрессором опухоли. Он содержит домен взаимодействия белка, необходимый для активации в случае повреждения генетического материала, и быстро фосфорилируется в ответ на блоки репликации и повреждение ДНК. Известно, что при активации кодируемый белок ингибирует фосфатазу CDC25C, предотвращая вступление в митоз, и стабилизирует белок-супрессор опухоли p53, что приводит к остановке клеточного цикла в G1 фазе. Кроме того, этот белок взаимодействует с BRCA1 и фосфорилирует его, позволяя BRCA1 восстанавливать выживаемость после повреждения ДНК. Мутации в этом гене связаны с синдромом Ли-Фраумени, высокопенетрантным фенотипом семейного рака, обычно связанным с наследственными мутациями в TP53. Кроме того, считается, что мутации в этом гене обуславливают предрасположенность к саркомам, раку молочной железы и опухолям головного мозга. Этот ядерный белок является членом подсемейства CDS1 серин-треониновых протеинкиназ [3].

Впервые мутации в гене CHEK2 были обнаружены в работе Bell et al. [4], в которой указывалось на 3 мутационные точки у лиц с наследственным синдромом Ли-Фраумени - это 2 варианта 1100delC и вариант 470T>C (Ple157Thr). С этих исследований началось

широкое изучение полиморфизма в этом гене и его связь с предрасположенностью к раку молочной железы.

Мутация в гене СНЕК2 (Pе157Thr) чаще всего наблюдается у пациенток, имеющих высокий риск развития эстроген-позитивного рака молочной железы, особенно в раннем возрасте. Согласно литературным данным, частота встречаемости данной мутации в России – 2,7% от всех случаев данного вида онкопатологии [5]. Наличие мутаций в этом гене также связывают с другими типами злокачественных новообразований: рака желудка, саркомы, рака почки и предстательной железы.

Наиболее изученными мутациями гена СНЕК2 в популяции российских пациентов являются следующие варианты: 1100delC, Pе157Thr, IVS2+1G>A, del5395. В Российской Федерации эти вышеперечисленные мутации включены в диагностические панели, однако популяционных исследований, характеризующих систематическую оценку встречаемости этих мутаций, не проводилось. Популяция Кабардино-Балкарской Республики не изучена по данному вопросу полностью.

В связи с этим целью данной работы является изучить частоту встречаемости высокопенетрантных мутаций СНЕК2 (1100delC, Pе157Thr) у больных раком молочной железы и здоровых жительниц Кабардино-Балкарии, а также выявить клинико-морфологические характеристики исследованных больных (возрастной состав, семейный анамнез, пик манифестации заболевания, менструально-овариальная функция, размер опухоли на момент постановки диагноза).

Материалы и методы исследования

Известно, что рак – это генетическое заболевание, вызванное накоплением мутаций, которые приводят к неконтролируемой клеточной пролиферации и метастазированию. Каждый этап канцерогенеза является результатом возникновения двух или более генетических нарушений, которые приводят к злокачественному росту опухоли. При накоплении генетических нарушений опухолевые клетки неограниченно пролиферируют, быстро распространяются и получают селективное преимущество перед другими клетками. В настоящее время постоянно проводятся попытки идентифицировать соматические мутации, которые связаны с появлением раковых клеток. Для этого необходимо сравнивать последовательности ДНК нормальных и опухолевых клеток, а также лиц, имеющих данное заболевание, и контрольную здоровую группу.

Для изучения встречаемости мутаций в гене СНЕК2 в популяции Кабардино-Балкарии была использована ДНК жительниц республики, выделенная из лимфоцитов периферической крови, и сформированы группы контроля и опыта. Опытная группа насчитывала 70 образцов ДНК женщин, больных раком молочной железы. В контроле

принимало участие 50 человек - это группа женщины, проживающих в республике, у которых данной онкопатологии не выявлено.

Для выявления клинико-морфологических особенностей развития ассоциированных опухолей были изучены истории болезней пациенток с морфологически верифицированным диагнозом РМЖ и исследуемой мутацией в данном гене. Клинические характеристики включали анализ возрастного состава опытной группы, пик манифестации заболевания, изучение семейного анамнеза и распределение больных по характеру менструально-овариальной функции, а также размер опухоли на момент постановки диагноза.

При генотипировании, в рамках исследований проводили анализ повторяющихся founder-мутаций в гене СНЕК2 - двух вариантов: 1100delC и 1e157Thr.

Для выделения ДНК использовали набор реагентов QIAamp DNA Blood Mini Kit (производитель – фирма Qiagen, Германия). При проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) был использован набор реагентов для проведения аллель-специфичной (АС) полимеразной реакции (производитель – ООО НПФ «Литех»). Амплифицированные специфические фрагменты ДНК выявляли методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Генотипирование проводили, также используя ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR).

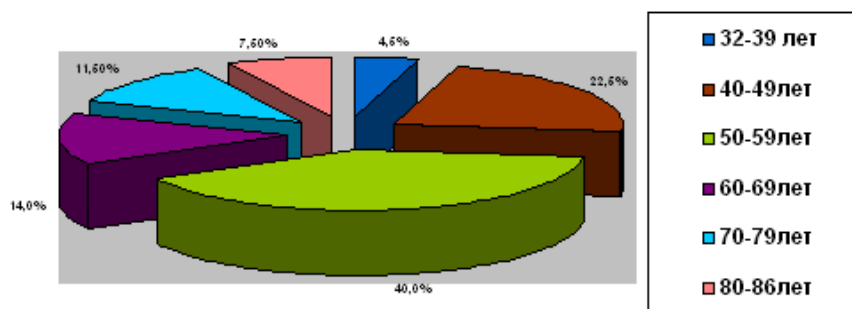
Статистическую обработку данных проводили, используя критерий хи-квадрат (χ^2).

Результаты исследования и обсуждение

Поиск мутаций 1100delC и 1e157Thr в гене СНЕК2 был проведен на образцах ДНК больных (n=70) и здоровых женщин (n=50) популяции КБР. Имеющаяся в распоряжении Медико-Биологического центра КБГУ коллекция образцов ДНК лимфоцитов периферической крови онкологических больных жителей Кабардино-Балкарии была собрана на базе Республиканского онкологического диспансера. Диагноз «рак молочной железы» был верифицирован морфологически. В ходе исследований проводилось анкетирование, где были собраны клинико-генетические и популяционные характеристики участников исследования.

Возраст участников эксперимента был от 32 до 86 лет. В наших исследованиях приняли участие женщины основных трех этнических групп, проживающие на территории республики: русские, кабардинцы и балкарцы. Этническая принадлежность была отмечена в связи с разным носительством мутаций и полиморфных вариантов в различных этнических группах.

При анализе возрастного состава участниц эксперимента были выявлены следующие возрастные диапазоны; опытная группа – возрастной диапазон 32-86 лет (средний возраст 75 лет). В контрольной группе возраст участниц эксперимента от 32 до 69 лет (средний возраст 41 год). Пик манифестации заболевания, развитие выраженных клинических проявлений болезни были отмечены в возрасте от 50 до 59 лет - 40% (рис.).



Возрастной состав опытной группы

Случаи онкопатологий в семье у исследуемой группы лиц

При проведении анкетирования нами было выявлено случаи заболевания онкологическими болезнями у родственников участниц эксперимента. У 5 пациенток (что составляет 7% от общей выборки) с диагнозом «рак молочной железы» в семьях были зафиксированы случаи заболевания раком разной локализации, в том числе были выявлены случаи носительства РМЖ.

Распределение больных раком молочной железы по характеру менструально-овариальной функции

Ранний возраст менархе и поздняя менопауза являются фактором повышенного риска возникновения рака молочной железы. Изменение гормональной функции яичников, повышенная выработка пролактина, изменение в работе щитовидной железы, гипофиза и гипоталамической системы должны рассматриваться как возможные сигналы к ранней диагностике и профилактическому осмотру у женщин [6].

Среди исследуемой опытной группы пациенток с РМЖ средний возраст менархе 13,6 года. Статистических различий по характеру менструально-овариальной функции среди контрольной и опытной группы не выявлено. Кроме того, учитывали вредное воздействие, которому подвергались люди в процессе работы на производстве, в результате которого злокачественные опухоли различной локализации могут возникать при длительном контакте со специфическими канцерогенами при выполнении профессиональных обязанностей. Среди анализируемой выборки 6 человек (8,5%) были подвержены такому воздействию.

Анализ частоты мутаций гена CHEK2 у больных раком молочной железы и здоровых доноров

В нашем исследовании проведено генотипирование образцов ДНК и изучена частота встречаемости мутаций в гене CHEK2 в контрольной и опытной группах.

Частота встречаемости мутаций в гене CHEK2 представлена в таблице.

Частота встречаемости мутаций в гене СНЕК2

| Мутация СНЕК2 | РМЖ (n=70) | | Контроль (n=50) | |
|------------------|------------|------|-----------------|---|
| | Позитивные | % | Позитивные | % |
| 1100delC | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pe157Thr | 9 | 12,8 | 0 | 0 |

Мутации 1100delC в гене СНЕК2 не были обнаружены в образцах, принадлежащих как контрольной, так и опытной группе. Данный акт является интересным, так как, согласно литературным данным, частота аллеля 1100delC в европейской популяции составляет 0,2-1,5% [7]. Ранее ученые из Финляндии и Нидерландов в своих работах выявили взаимосвязь между носительством мутации 1100delC в гене СНЕК2 и развитием РМЖ [8; 9]. В результате этой мутации при считывании мРНК происходит сдвиг рамки считывания и образование стоп-кодона, что в свою очередь приводит к синтезу дефектного белка.

В исследовании среди анализируемой группы лиц больных РМЖ выявлен высокий показатель носительства мутации гена СНЕК2 Pe157Thr. Из 70 генотипированных образцов у 9 человек были отмечены замены аминокислоты изолейцин на треонин, что составило 12,8% от общей выборки ($\chi^2=3,88$; $p=0.05$).

При анализе клинко-морфологических особенностей можно отметить более ранний возраст манифестации заболеваний у носителей данной мутации. Согласно литературным данным, мутация в гене СНЕК2 Pe157Thr достаточно распространена в мире и ассоциирована с наследственными формами РМЖ [10]. При проведении генотипирования в контрольной группе, среди здоровых лиц, исследованных мутаций не выявлено.

В ходе исследований также были изучены клинко-морфологические характеристики течения болезни лиц с диагнозом РМЖ. В эту часть исследования были включены пациентки с анализируемой мутацией Pe157Thr гена СНЕК2. У 9 пациенток, согласно клиническим наблюдениям, на момент установления диагноза средний размер опухоли варьировал от 2 до 5 см, как и в общей опытной группе (82%), т.е. статистически значимых различий не установлено ($p=0,038$).

Изучение молекулярных механизмов, ведущих к появлению злокачественных новообразований, является современным требованием при диагностике и лечении онкологических заболеваний. Установление механизмов инактивации гена СНЕК2, в результате которого происходит прекращение продукции белка опухолевого супрессора либо синтез его неактивной формы, позволяет выявить новые возможности при таргетной

терапии в лечении рака. Изучение механизмов подавления работы гена супрессора СНЕК2 и отсутствие контроля при прохождении клеткой цикла деления, а также нарушение в работе систем репарации и апоптоза является актуальной задачей, стоящей перед исследователями.

Заключение

В популяции Кабардино-Балкарии на анализируемой выборке выявлена высокая частота носительства (12,8%) мутации Pе157Thr, данная мутация обнаружена у 9 женщин (n=70). Мутация 1100delC в гене СНЕК2 на данной изучаемой выборке не обнаружена. В дальнейшем планируется продолжить работу по увеличению анализируемой выборки и выявлению носительства других мутаций в гене СНЕК2 с целью определить генетические группы риска и причины роста онкозаболеваемости в республике.

Список литературы

1. Эпидемиология РМЖ в интерактивных диаграммах. [Электронный ресурс]. URL: <https://protiv-raka.ru/analytics/epidemiologiya-rmzh-v-interaktivnyh-diagrammah/> (дата обращения: 25.10.2022).
2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году. М.: МНИОН им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. 239 с.
3. Apostolou P, Papasotiriou I. Current perspectives on СНЕК2 mutations in breast cancer. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2017. vol. 12. no. 9. P. 331-335.
4. Bell D.W. et al. Heterozygous germ line СНЕК2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science*. 1999. vol. 286. no. 5449. P. 2528 – 2531.
5. Алексахина С.Н., Характеристика СНЕК2-ассоциированных опухолей молочной железы. автореф. дис. ... кан. биол. наук. Санкт-Петербург, 2019. 24 с.
6. Биттуева М.М., Боготова З.И., Даурова Л.В., Гидова Э.М., Паритов А.Ю, Хандохов Т.Х., Ситников М.Н., Керефова М.К. Наследственная предрасположенность и клинимоρφологические особенности рака молочной железы у жительниц Кабардино-Балкарии // *Современные проблемы науки и образования*. 2014. №.6, С. 1364. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=15523> (дата обращения: 25.10.2022).
7. Hu C., Hart S.N., Gnanaolivu R. et al. A population-based study of genes previously implicated in breast cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2021. vol. 384. P. 440-451.
8. Massink MP, Kooi IE, Martens JW, Waisfisz Q, Meijers-Heijboer H. Genomic profiling of СНЕК2*1100delC-mutated breast carcinomas. *BMC Cancer*. 2015. vol. 9. no. 15 P. 877.

9. Wendt C, Muranen TA, Mielikäinen L, Thutkawkorapin J, Blomqvist C, Jiao X, et al. A search for modifying genetic factors in CHEK2:c.1100delC breast cancer patients *Scientific Reports*. 2021. vol 20. no. 11(1). P.14763.
10. Sokolenko AP, Imyanitov EN. Molecular Diagnostics in Clinical Oncology. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2018. vol. 27. no. 5. P. 76.