

ГОРОДЕЦЬКА Є. В.<sup>1</sup>, СЕРГА С. В.<sup>1</sup>, ЛАГУТА Т. І.<sup>1</sup>, ЛЕВКОВИЧ Н. М.<sup>2</sup>, АНІКУСЬКО М. Ф.<sup>3</sup>, ТИМОВСЬКА Ю. О.<sup>3</sup>, ЧЕШУК В. Є.<sup>3</sup>, СМОЛАНКА І. І.<sup>4</sup>, СКЛЯР С. Ю.<sup>4</sup>, ПОЛЕНКОВ С. Е.<sup>5</sup>, БОЙЧЕНКО О. І.<sup>6</sup>, ДЕМИДОВ С. В.<sup>1</sup>, ЖУК О. В.<sup>1</sup>, КОЗЕРЕЦЬКА І. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології», Україна, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64, e-mail: liza.gorodetskaya@gmail.com

<sup>2</sup>Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика МОЗ України, Україна, 04112, м. Київ, вул. Дорогожицька, 9, e-mail: nata.levkovich83@gmail.com

<sup>3</sup>Київський міський онкологічний центр, Україна, 03115, м. Київ, вул. Верховинна, 69, e-mail: timovska79@gmail.com

<sup>4</sup>Національний інститут раку, Відділення пухлин грудної залози та її реконструктивної хірургії, Україна, 03022, м. Київ, вул. Ломоносова, 33/43, e-mail: iislomanka@gmail.com

<sup>5</sup>Чернігівський обласний онкологічний диспансер, Україна, 14029, м. Чернігів, проспект Миру, 211, e-mail: dokpolenkov@rambler.ru

<sup>6</sup>Житомирський обласний онкологічний диспансер, Україна, 10013, м. Житомир, вул. Феценка-Чопівського, 24/4, e-mail: aleksandr-bojchenko@yandex.ru

## ЧАСТОТИ МУТАЦІЇ 5382INSC ГЕНА *BRCA1* У ЖІНОК, ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ, В ТРЬОХ ОБЛАСТЯХ УКРАЇНИ

Рак молочної залози (РМЗ) — онкологічне захворювання, що зустрічається у жінок найбільш часто. Щорічно в світі ця патологія виявляється у 1,4 млн пацієнток. З року в рік частота діагностованих випадків РМЗ неухильно зростає в усіх країнах світу і складає від загальної онкологічної захворюваності в Європі — 25%, США — 30%, Росії — 20,1% [1]. В Україні щорічно виявляється близько 16–17 тис. хворих на РМЗ, а показники захворюваності складають приблизно 66 випадків на 100 тис. населення [2]. Дослідження функції генів *BRCA1* (breast cancer 1) та *BRCA2* (breast cancer 2) дозволило виявити асоціації гермінальних мутацій цих генів зі спадковими формами РМЗ. Частота спадкового РМЗ становить 5–20%, і мутації генів *BRCA1/2* відіграють значну роль у формуванні цієї патології [3, 4]. Ген *BRCA1* (OMIM\*113705) локалізований на ділянці хромосоми 17q21.1.–21.2. Більше 70% мутацій гена *BRCA1* належать до мікро- та міні-делецій, що призводять до зсуву рамки читування. Спектр мутацій гена *BRCA1* сильно варіює між різними популяціями та етнічними групами, і в кожному регіоні є свої набори мажорних і мінорних мутацій, що можуть стати причиною виникнення захворювання [7–11]. За даними низки досліджень, у населення Східної та Центральної Європи (Польща, Литва, Німеччина, Угорщина, Росія та Україна) найчастіше зустрічаються три мажорні мутації: дві в гені *BRCA1* (5382insC і 185delAG) та одна в гені *BRCA2* (6174delT) [1, 5]. Роботи, що опубліковані за результатами

молекулярно-генетичних досліджень, проведених в різних регіонах України, дозволили визначити частоту мутацій в гені *BRCA1* у жінок з РМЗ [12–15]. Проведені раніше дослідження поширеності зазначених мутацій в цих країнах демонструють «ефект засновника» мутації 5382insC в гені *BRCA1* (частота 70–90% за даними різних авторів).

Метою цього дослідження був порівняльний аналіз частоти мутації 5382insC гена *BRCA1* у жінок, хворих на РМЗ, що проживають у різних областях України.

### Матеріали і методи

До дослідження було залучено 155 жінок, хворих на РМЗ. Діагноз РМЗ встановлювався лікарем-онкологом в умовах онкологічного диспансеру. Всі жінки підписали інформовану згоду на участь у дослідженні.

Матеріалом для молекулярно-генетичного дослідження слугувала периферійна кров, що зберігалася в закритих системах для забору венозної крові з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) як антикоагулянта.

Виділення геномної ДНК з периферійної крові проводили фенольним методом за стандартним протоколом. Наявність мутації 5382insC гена *BRCA1* визначали методом мутаційно-індукованої ПЛР з використанням специфічних праймерів [16]. Для ідентифікації мутації ставили дві реакції: в першу додавали загальний (P1) та специфічний для алеля дикого типу (P2) праймери,

в другу — загальний (P1) та специфічний до мутантного алеля (P3) праймери.

Реакція ампліфікації проводилась у об'ємі 20 мкл (2 мкл 10хПЛР-буферу (10X DreamTaq Buffer, «Thermo Scientific», USA), 2 мкл 2 мМ dNTP («Thermo Scientific», USA), 2 мкл 2,5mM MgCl<sub>2</sub> («Thermo Scientific», USA), по 0,4 мкл 20 мМ праймерів, 0,2 мкл Taq-полімерази (5 од. акт/мкл «Thermo Scientific», USA), 10 мкл дистильованої води) та 3 мкл геномної ДНК. Температурний режим реакції був таким: 3 хв при 95 °С, 40 циклів, кожен з яких включав по 30 с при 94 °С, 25 с при 57 °С та 30 с при 72 °С і кінцева стадія елонгації 4 хв при 72 °С.

Після проведення ПЛР 4 мкл ампліконів переносили на 8% поліакриламідний гель (6,5 мл дистильованої води, 2,7 мл поліакриламідну (29 г акриламід, 1 г бісакриламід, 100 мл дистильованої води), 1 мл 10хТВЕ (108 г Tris base, 55 г борної кислоти, 40 мкл 0.5М ЕДТА), 70 мкл 10% персульфату амонію та 15 мкл TEMED (тетраметилетилендіамін). Сила струму становила 40мА, а напруга — 170 В.

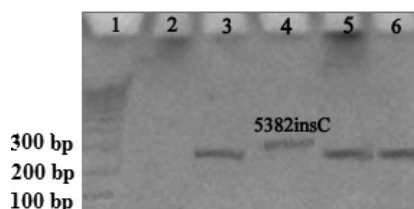
Статистичну обробку даних проводили з використанням пакета статистичних програм Microsoft Excel. Різницю досліджуваних частот визначали за F критерієм. За рівень статистичної значущості приймали  $P < 0,05$ .

### Результати та обговорення

Результати молекулярно-генетичного аналізу дозволили визначити частоту мутації 5382insC гена *BRCA1* у жінок групи дослідження. Загалом 9 жінок (5,8%) з 155 мали зазначену мутацію.

Електрофореграма продуктів ампліфікації наведена на рис. 1.

За регіоном проживання спостерігався такий розподіл мутацій у пацієток: Київська



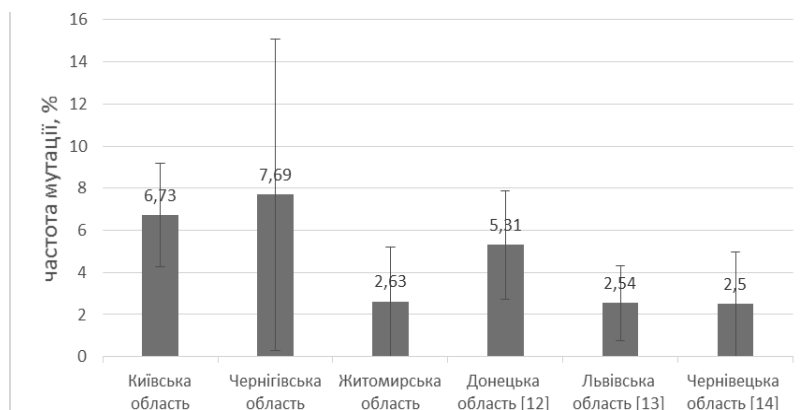
**Рис. 1.** Електрофореграма продуктів ампліфікації гена *BRCA1*: 1 — маркер молекулярної ваги 100bp; 2 — негативний контроль; 3, 4 — мутація 5382insC в гетерозиготному стані; 5, 6 — генотип «дикий» тип

(104 хворих, з них 7 з мутацією), Чернігівська (13 хворих, 1 з мутацією) та Житомирська область (38 хворих, 1 з мутацією). Обраховані частоти склали:  $6,73 \pm 2,45\%$  для Київської області,  $2,63 \pm 2,59\%$  — для Житомирської та  $7,69 \pm 7,39\%$  — для Чернігівської. Частоти мутації 5382insC в цих областях достовірно не відрізнялися між собою ( $F = 0,53$ ,  $P > 0,05$ ).

Для жінок, хворих на РМЗ, з Донецької області колективом авторів [12] визначено частоту мутації 5382insC гена *BRCA1*, яка склала  $5,31 \pm 2,3\%$ . У Львівській області із 78 пацієток з РМЗ мутація 5382insC гена *BRCA1* була виявлена у 2 хворих, що становило  $2,6 \pm 1,7\%$  [13]. У Чернівецькій області мутація 5382insC гена *BRCA1* виявлена у 1 пацієнтки ( $2,5 \pm 2,46\%$ ) з 40 [14]. Результати зіставлення частот мутації 5382insC гена *BRCA1* в різних регіонах України представлено на рис. 2.

### Висновки

Проведений аналіз не виявив достовірних відмінностей у розподілі частоти мутації 5382insC гена *BRCA1* у пацієток з РМЗ, що проживають у різних регіонах України.



**Рис. 2.** Частота мутації 5382insC гена *BRCA1* в різних областях України

## ЛІТЕРАТУРА

1. Мерабишвили В. М. Рак молочной железы: заболеваемость, смертность, выживаемость (популяционное исследование) // Вопросы онкологии. — 2011. — 57, № 5. — С. 609–615.
2. Рак в Україні 2012–2013. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби // Бюлетень національного канцер-реєстру в Україні. — 2013. — 15. — С. 3–7.
3. Petrucelli N., Daly M. B., Feldman G. L. *BRCA1* and *BRCA2* Hereditary Breast and Ovarian Cancer [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247>.
4. Campeau P. M., Foulkes W. D., Tischkowitz M. D. Hereditary breast cancer: New genetic developments, new therapeutic avenues // *Human Genetics*. — 2008. — 124 (1). — P. 31–42.
5. Janavičius R. Founder *BRCA1/2* mutations in the Europe: implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control // *EPMA J.* — 2010. — 1. — P. 397–412.
6. Tom Walsh, Silvia Casadei, Kathryn Hale Coats, Elizabeth Swisher, Sunday M. Stray, Jake Higgins, Kevin C. Roach, Jessica Mandell, Ming K. Lee, Sona Ciernikova, Lenka Foretova, Pavel Soucek, Mary-Claire King Spectrum of mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, and *TP53* in families at high risk of breast cancer // *JAMA*. — 2006. — 295 (12). — P. 1379–1388.
7. Tong A., Kelly S., Nusbaum R., Graves K., Peshkin B. N., Valdimarsdottir H. B., Wood M., McKinnon W., Garber J., McCormick S. R., Jandorf L., Schwartz M. D. Intentions for risk-reducing surgery among high-risk women referred for *BRCA1/BRCA2* genetic counseling // *Psychooncology*. — 2014. Doi: 10.1002/pon.3560.
8. Karami F., Mehdipour P. A comprehensive focus on global spectrum of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in breast cancer // *Biomed Res Int.* — 2013. Doi: 10.1155/2013/928562.
9. Navarro de Souza A, Groleau D, Loisel CG, Foulkes WD, Wong N. Cultural aspects of healthy *BRCA* carriers from two ethnocultural groups // *Qual Health Res.* — 2014. — 24. — P. 665–681.
10. Sharma P., Klemp J. R., Kimler B. F., Mahnken J. D., Geier L. J., Khan Q. J., Elia M., Connor C. S., McGinness M. K., Mammen J. M., Wagner J. L., Ward C., Ranallo L., Knight C. J., Stecklein S. R., Jensen R. A., Fabian C. J., Godwin A. K. Germline *BRCA* mutation evaluation in a prospective triple-negative breast cancer registry: implications for hereditary breast and/or ovarian cancer syndrome testing // *Breast Cancer Res Treat.* — 2014. — 145. — P. 707–714.
11. Rubinstein W. S. Hereditary breast cancer in Jews // *Fam Cancer.* — 2004. — 3. — P. 249–257.
12. Бондарь Г. В., Седаков И. Е., Кайряк О. В., Скочиляс Т. Л., Фефелов А. И., Смирнов В. Н. *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы Донецкой области // Медико-соціальні проблеми сім'ї. — 2009. — 14, № 4. — С. 53–58.
13. Кіцера Н. І., Шпарик Я. В., Білинський Б. Т., Тріль О. В. Аналіз мутацій у генах *BRCA1/2* у хворих на сімейний/спадковий рак молочної залози, які проживають у Львівській області (Україна) // Онкологія. — 2012. — № 11. — С. 44–49.
14. Крук Т. В., Пересунько О. В., Волков Р. А. Молекулярно-генетичне вивчення типів мутацій гену *BRCA1* у хворих на рак молочної залози та їх родичів Чернівецької області України // Новоутворення. — 2012. — 12. — С. 310–314.
15. Довженко С. П., Расси Х., Захарцева Л. М., Подольская С. В., Мясоедов Д. В., Горovenko Н. Г. Некоторые факторы риска развития рака молочной железы и прогноз течения заболевания // Лікарська справа. — 2007. — № 7. — С. 80–82.
16. Chan P. C., Wong B. Y., Ozcelik H., Cole D. E. Simple and rapid detection of *BRCA1* and *BRCA2* mutations by multiplex mutagenically separated PCR // *Clin Chem.* — 1999. — 45. — P. 1285–1287.
17. Negură L., Carasevici E., Negură A., Uhrhammer N., Bignon Y.-J. Identification of a recurrent *BRCA1* mutation in two breast/ovarian cancer predisposition families with distinct phenotypes, by allele-specific multiplex-PCR // *Romanian Review of Laboratory Medicine.* — 2010. — 18 (2). — P. 53–61.

GORODETSKA I.V.<sup>1</sup>, SERGAS.V.<sup>1</sup>, LEVKOVICH N.M.<sup>2</sup>, LAHUTA T.I.<sup>1</sup>, ANIKUSKO N.F.<sup>3</sup>, TYMOVSKA Yu.O.<sup>3</sup>, CHESHUK V. Ie.<sup>3</sup>, SMOLANKA I.I.<sup>4</sup>, SKLYAR S. Yu.<sup>4</sup>, POLENKOV S.E.<sup>5</sup>, BOICHENKO O.I.<sup>6</sup>, DEMYDOV S.V.<sup>1</sup>, ZHUK O.W.<sup>1</sup>, KOZERETSKA I.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Taras Shevchenko National University of Kyiv, Educational and Scientific Centre «Institute of Biology», Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str., 64, e-mail: liza.gorodetskaya@gmail.com

<sup>2</sup> Shupik National Postgraduate Education Medical Academy, Ukraine, 04112, Kyiv, Dorohozhytska str., 9, e-mail: levkovich83@mail.ru

<sup>3</sup> Kiev municipal clinical oncological centre, Ukraine, 03115, Kyiv, Verkhovyna str., 69, e-mail: timovska79@gmail.com

<sup>4</sup> Ukrainian National Cancer Institute, Ukraine, 03022, Kyiv, Lomonosova str., 33/43, e-mail: iislomanka@gmail.com

<sup>5</sup> Chernihiv Regional Oncology Center, Ukraine, Ukraine, 14029, Chernihiv, Miry av., 211, e-mail: dokpolenkov@rambler.ru

<sup>6</sup> Zhytomyr Regional Oncology Center, Ukraine, Zhytomyr, 10013, Feschenko-Chopyvskoho str., 24/4, e-mail: aleksandr-bojchenko@yandex.ru

### THE FREQUENCY OF *BRCA1* MUTATION 5382INSC AMONG WOMEN WITH BREAST CANCER FROM THREE REGIONS OF UKRAINE

**Aims.** Breast cancer ranks first among cancers of the female population in Ukraine and in most countries abroad. However, data on the mutations frequencies in Ukraine for *BRCA1* gene is limited. We investigated the variation and frequency of mutations in gene *BRCA1* among patients with breast cancer in three regions of Ukraine. **Methods.** Mutation 5382insC was screened by PCR using specific primers as described in Negură L., et al., 2010, with some optimization. **Results.** In total, we screened 155 breast cancer patients for the 5382insC mutation. Nine *BRCA1* mutations 5382insC were detected ( $5.8 \pm 1.87\%$ ). The study was conducted in Kyiv region (104 patients, including 7 with mutation), Chernihiv region (13 patients, 1 with mutation) and Zhytomyr region (38 patients, 1 with mutation). **Conclusions.** Frequencies of 5382insC did not differ between three regions and from the data obtained by our colleagues in Donetsk, Lviv and Chernivtsi regions. **Keywords:** *BRCA1*, 5382insC, mutation, Ukraine.