

Андижанский государственный медицинский институт, Андижан, Узбекистан

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РИСКА РАЗВИТИЯ РАКА ЯИЧНИКА — МУТАЦИИ ГЕНОВ *BRCA1* И *BRCA2* В АНДИЖАНСКОЙ ОБЛАСТИ



Д.З. Мамарасулова,
Я.С. Мамадалиева, З.А. Эргашева,
Ю.Д. Азизов

Адрес:

Дилфузахон Мамарасулова
170100, Андижан, 2-й микрор-н, дом 3, кв. 41
Тел.: +99 (890) 258-05-59; +99 (874) 226-14-47
Факс: +99 (874) 237-54-33
E-mail: dilya_o@mail.ru

Ключевые слова: рак яичника, генетическая мутация, *BRCA1*, *BRCA2*, рак грудной железы.

Цель исследования — оценить частоту встречаемости шести известных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* в выборках больных раком яичника (208 пациентов). Материалы — блоки гистологических препаратов. Генотипирование проведено методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием набора «ОнкоГенетика BRCA» (расширенная комплектация; ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Работа тест-систем основана на модифицированном методе «примыкающих проб» (kissing probes). Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием детектирующего амплификатора ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология»). Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* были выявлены у 11,1% больных раком яичника. Мутация 5382insC в 20-м экзоне гена *BRCA1* составила 8,7% выборки пациентов с раком яичника. У близких родственников — 2% (n=50). Высокая частота мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* больных раком яичника подтверждает необходимость тотального генетического скрининга в этой группе. Анализ на наличие мутаций в генах *BRCA1* (4153delA, 5382insC, Cys61Gly, 2080delA, 3819delGTAAG, 3875delGTCT) и *BRCA2* (6174delT) может быть рекомендован для включения в скрининговые программы по выявлению наследственных случаев рака яичника. Генетический скрининг позволяет идентифицировать большинство случаев наследственных форм у больных раком яичника с последующей индивидуализацией лечения пациенток и направить усилия на профилактику и раннюю диагностику заболеваний при выявлении мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у здоровых женщин.

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени идентифицировано и охарактеризовано два гена, наследуемые мутации в которых приводят к возникновению семейных форм рака грудной железы и рака яичника, — *BRCA1* и *BRCA2* (от BRCAst CAncer — рак грудной железы) [1, 6]. У всех родственников в семье, имеющих один и тот же патологический вариант гена, повышается риск развития онкологического заболевания. Этот риск в течение жизни, по некоторым данным, приближается к 90% [4, 6]. Еще более важно, что риск развития заболевания в молодом возрасте у носителей мутаций приблизительно в 10 раз превышает общий риск в популяции. Часто в одной семье выявляют случаи и рака грудной железы, и рака яичника [2, 7].

Выявление мутаций с последующей диспансеризацией пациентов позволяет предотвратить развитие заболевания у пациентов с мутациями и их родственников. Не следует думать, что все случаи рака обусловлены наследуемыми мутациями, а склонность к заболеванию

всегда передается по наследству. Около 85% случаев рака грудной железы возникают спорадически, и только 15% имеют наследственный генез [3, 5, 8].

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ проводился в Научно-диагностическом центре «Immunogen Test» города Ташкента (Узбекистан) под руководством доктора медицинских наук Т.Р. Хегай.

Материалом исследования являлись архивные патоморфологические препараты 208 больных с верифицированным диагнозом рака яичника, полученные из удаленных в ходе операции опухолевых тканей пациенток.

Выделение ДНК производили посредством стандартного протокола. При помощи микротомы были получены секции толщиной 20 мкм, которые депарафинизировали с помощью инкубации в 3 сменах ксилола по 500 мл при температуре 37 °С. Длительность инкубации в каждой смене ксилола составляла 20 мин. Частичную регидратацию тканей осуществляли

инкубацией по 10 мин в 3 сменах этанола (96%, затем 80 и 70% — по 500 мкл) при комнатной температуре. После удаления этанола секции подсушивали на воздухе и помещали в 200 мкл лизирующего раствора (ЮТМ Трис-НСI, рН=8,3; 1 мМ EDTA; 2% Тритон X-100, протеиназы К — до 500 мкг/мл). Лизис проводили при 60 °С в течение 12–24 ч, после чего образцы инкубировали на протяжении 10 мин при 95 °С с целью полной инактивации протеиназы К. Полученный лизат десятикратно разводили бидистиллированной водой [4, 9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При тестировании на наличие мутаций *BRCA1* *BRCA1_4153delA*, *BRCA1_5382insC*, *BRCA1_3819delGTAAA*, *BRCA1_300T>G (Cys61GLY)*, *BRCA1_2080delA*, *BRCA1_185delA*, *BRCA1_3875delA*, *BRCA2_2080delA*, *6174delT* не выявлено статистически значимой ассоциации между группами больных и ближайшими родственниками, однако при суммарной корреляции всех мутаций отмечено статистически значимое различие между группами. Мутации в группе больных раком составили 11,1%, а в группе здоровых лиц — 2%, что явилось статистически значимым различием $\chi^2=3,92$, $p=0,048$.

Таким образом, наличие мутации в любом из тестированных аллелей в любой комбинации выявлено в 24 (9,3%) из 258 случаев. В группе

здоровых участников мутации выявлены в 2% случаев, а у больных раком яичника — в 11,1%. Это свидетельствует о том, что наличие мутации *BRCA1/2* хотя и имеет тенденцию к ассоциации с раком яичника, тем не менее не может быть чувствительным диагностическим маркером. Существует необходимость выявления других факторов, играющих значимую роль в онкогенезе наряду с вышеуказанными генетическими маркерами (табл. 1).

Преобладала мутация *5382insC (BRCA1)* — 4,0% выборки больных раком грудной железы, 11,6% выборки больных раком яичника, что согласуется с данными многочисленных работ отечественных и зарубежных авторов, в которых показано превалирование мутации *5382insC* в гене *BRCA1* в различных областях Андijanской области. У здоровых ближайших родственников повышенный риск развития рака яичника зафиксирован у 2%, что свидетельствует о высоком риске возникновения злокачественного новообразования.

Пять мутаций — *4153delA*, *5382insC*, *Cys61Gly*, *2080delA*, *3819delGTAAA* в гене *BRCA1* — были зарегистрированы и у больных раком яичника, а у здоровых участников, подверженных риску развития рака, — мутация *5382delA*.

Интерес также представляет наличие выявленных мутаций в различных гистологических группах. Среди больных со светлоклеточной гистологической опухолью частота мутаций отме-

чена у 10 (20,1%) в сосочковой форме опухоли, у 2 (17,5%) — в дистерминоме, 13,3% — в эмбриональной опухоли, 12,5% — тератобластоме, и гранулезоклеточная опухоль составила 5,6 и 5,0% соответственно (табл. 2).

При рассмотрении данных по выживаемости больных раком яичника в группах с наличием или отсутствием *BRCA1/2* анализ по Каплану — Мейеру не выявил статистически достоверной значимости. Интервал достоверности (95% доверительный интервал) в обеих группах широко варьировал, что, возможно, свидетельствует о влиянии других факторов.

ВЫВОДЫ

Диагностическую панель, включающую пять мутаций (*4153delA*, *5382insC*, *3819delGTAAA*, *Cys61Gly*, *2080delA* в гене *BRCA1*), можно рекомендовать в качестве стандартной для первичного генетического скрининга пациентов, направленных на обследование в учреждении здравоохранения для выявления наследственной предрасположенности к раку яичника и подтверждению генетического диагноза наследственной формы злокачественного новообразования (рака яичника).

Генетический скрининг позволяет идентифицировать большинство случаев наследственных форм у больных раком яичника с последующей индивидуализацией лечения пациенток и направить усилия на профилактику и раннюю диагностику заболеваний при выявлении мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у здоровых женщин.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Батенева Е.И., Мещеряков А.А., Любченко Л.Н. и др. (2011) Частота одиннадцати мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2* в неотобранной выборке больных раком молочной железы россиянок. Уральский Медицинский журнал, 3 (81): 69–73.
2. Грудина Н.А., Голубков В.И., Тихомирова О.С. и др. (2005) Преобладание широко распространенных мутаций в гене *BRCA1* у больных семейными формами рака молочной железы Санкт-Петербурга. Генетика, 41(3): 405.
3. Давыдов М.И., Аксель Е.М. (2011) Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2009 году. Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, 22(3):85.
4. Кофиади И.А., Ребриков Д.В. (2006) Методы детекции однонуклеотидных полиморфизмов: аллель-специфичная ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой. Генетика, 42(1): 22–32.
5. Любченко Л.Н. (2009) Наследственный рак молочной железы и/или яичников: ДНК-диагностика, индивидуальный прогноз, лечение и профилактика. Москва, РОНЦ им. Н.Н. Блохина, 2009.
6. Ferla R., Calò V., Cascio S. et al. (2007) Founder mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes. Ann. Oncol., 18 (suppl 6): 93–98.
7. Gayther S.A., Harrington P., Russell P. et al. (1997) Frequently occurring germ-line mutations of the *BRCA1* gene in ovarian cancer families from Russia. Am. J. Hum. Genet., 60: 1239–1242.
8. Крылова Н.У., Лобелко О.С., Сокотенко А.Р. et al. (2006) *BRCA1* 4153del A founder mutation in Russian ovarian cancer patients. Hered. Cancer Clin. Pract., 4(4): 193–196.
9. Lalwani N., Prasad S.R., Vikram R. et al. (2011) Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: Implications for diagnosis and treatment. Radiographics, 31(3): 625–646.

Таблица 1. Частота встречаемости мутаций в гене *BRCA1/2* в группах больных раком яичника и здоровых родственников

Наличие мутации в гене <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i>	Наличие мутаций	Рак яичника		Здоровые	
		п	%	п	%
<i>BRCA1_185delAG</i>	нет	208	100	50	100
	есть	0	0	0	0
<i>BRCA1_4153delA</i>	нет	202	97,1	50	100
	есть	6	2,9	0	0
<i>BRCA1_5382insC</i>	нет	190	91,3	49	98
	есть	18	8,7	1	2
<i>BRCA1_3819delGTAAA</i>	нет	205	98,6	50	100
	есть	3	1,4	0	0
<i>BRCA1_3875delGTCT</i>	нет	208	100	50	100
	есть	0	0	0	0
<i>BRCA1_300T>G(Cys61GLY)</i>	нет	206	99	50	100
	есть	2	1	0	0
<i>BRCA1_2080delA</i>	нет	205	98,6	50	100
	есть	3	1,4	0	0
<i>BRCA2_6174delT</i>	нет	208	100	50	100
	есть	0	0	0	0
<i>BRCA</i>	нет	185	88,9	49	98,0
	есть	23	11,1	1	2,0

Таблица 2. Наличие мутаций в различных гистологических группах

Тип опухоли	Нет мутаций		Есть мутация	
	п	%	п	%
Светлоклеточная	4	1 (0,7)	1	4,2
Сосочковая	47	20,1	10	41,7
Дистерминома	13	5,6	2	8,3
Эмбриональная	7	3,0	1	4,2
Недифференцированная	23	9,8	3	12,5
Серозная	39	16,7	4	16,7
Тератобластома	17	7,3	1	4,2
Гранулезоклеточная	19	8,1	1	4,2

Оцінка генетичного ризику розвитку раку яєчника — мутації генів *BRCA1* і *BRCA2* в Андижанській області

Д.З. Мамарасуллова, Я.С. Мамадалиєва, З.А. Ергашева, Ю.Д. Азізов
Андижанський державний медичний інститут, Андижан,
Узбекистан

Резюме. Мета дослідження — оцінити частоту шести відомих мутацій в генах *BRCA1* і *BRCA2* у вибірках хворих на рак яєчника (208 пацієнтів). Матеріали — блоки гістологічних препаратів. Генотипування проведено методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу з використанням набору «ОнкоГенетика BRCA» (розширена комплектація; ТОВ «НВО ДНК-Технологія», Росія). Робота тест-систем заснована на модифікованому методі «примикальних проб» (kissing probes). Полімеразну ланцюгову реакцію проводили з використанням детектуючого ампліфікатора ДТпрайм (ТОВ «НВО ДНК-Технологія»). Мутації в генах *BRCA1* і *BRCA2* були виявлені у 11,1% хворих на рак яєчника. Мутація 5382insC в 20-му екзоні гена *BRCA1* становила 8,7% вибірки пацієнтів із раком яєчника. У близьких родичів — 2% (n=50). Висока частота мутацій у генах *BRCA1* і *BRCA2* хворих на рак яєчника підтверджує необхідність тотального генетичного скринінгу в цій групі. Аналіз наявності мутацій у генах *BRCA1* (4153delA, 5382insC, Cys61Gly, 2080delA, 3819del-GTAAA, 3875delGTCT і *BRCA2* (6174delT) може бути рекомендований для включення в скринінгові програми з виявлення спадкових випадків раку яєчника. Генетичний скринінг дозволяє ідентифікувати більшість випадків спадкових форм у хворих на рак яєчника з подальшою індивідуалізацією лікування пацієнок і спрямувати зусилля на профілактику та ранню діагностику захворювань при виявленні мутацій в генах *BRCA1* і *BRCA2* у здорових жінок.

Ключові слова: рак яєчника, генетична мутація, *BRCA1*, *BRCA2*, рак грудної залози.

Results of the genetic testing of germline mutations in genes *BRCA1* and *BRCA2* in ovarian cancer in Andijan region

D.Z. Mamarasulova, Ya.S. Mamadalieva, Z.A. Ergasheva, U.D. Azizov
Andijan State Medical Institute, Andijan, Uzbekistan

Summary. Objective of the study — to evaluate the frequencies of occurrence of six known mutations in genes *BRCA1* and *BRCA2* in unselected patient populations with ovarian cancer (208 patients) and their next of kin (n= 50). Materials: genotyping was performed through real-time polymerase chain reaction technology using a set «OncoGenetics BRCA» (LLC «Research and Production Company DNA-Technology», Russia). The operation of testing systems is based on a modified technique of «kissing probes». Polymerase chain reaction was performed using a detecting amplifier DTprime (LLC «Research and Production Company DNA-Technology»). Mutations in genes *BRCA1* and *BRCA2* were identified in 11.1% of patients with ovarian cancer. Mutation 5382insC in exon 18 of gene *BRCA1* made up 8.7% of patient population with ovarian cancer. The high frequency of mutation in genes *BRCA1* and *BRCA2* in patients with ovarian cancer confirms the necessity to conduct total genetic testing for this patient group. Analysis of mutations in genes *BRCA1* (4153delA, 5382insC, Cys61Gly, 2080delA, 3819delGTAAA, 3875del-GTCT) and *BRCA2* (6174delT) can be recommended for inclusion in the screening programs to detect hereditary cases of ovarian cancer. Genetic screening can identify most cases of hereditary forms of ovarian cancer patients with subsequent individualization of treatment of patients and to focus efforts on prevention and early diagnosis of diseases in the identification of mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes in healthy women.

Key words: ovarian cancer, genetic mutation, *BRCA1*, *BRCA2*, breast cancer.