

## ВИЗНАЧЕННЯ ІМОВІРНИХ НОСІЇВ МУТАЦІЙ *BRCA1* ТА *BRCA2* СЕРЕД ЖІНОК З РАКОМ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ТА БЕЗ НЬОГО

Л.А. Рибченко, С.В. Клименко

Державна установа «Національний науковий центр радіаційної  
медицини НАМН України» (Київ)

### Вступ

Мутації в генах *BRCA1* та *BRCA2* спричиняють високий ризик розвитку раку молочної залози (РМЗ) та раку яєчників (РЯ). За об'єднаними даними 22 досліджень серед випадкової вибірки РМЗ середній кумулятивний ризик розвитку даного захворювання для носіїв мутацій *BRCA1* становить 65%, а для носіїв *BRCA2* патогенних алелей 45%. Вірогідність захворювання на РЯ у *BRCA1* та *BRCA2*-позитивних осіб складає 39% та 11%, відповідно [4]. Враховуючи низьку поширеність *BRCA1* та *BRCA2* генів [5], розмір та спектр їх молекулярних варіантів стає очевидним, що проводити генетичне дослідження на наявність мутацій всім жінкам неможливо. Тому, перш ніж його здійснювати, необхідно оцінити ймовірність носійства мутацій. За кордоном для визначення ризику носійства мутаційних алелей застосовують алгоритми прогнозу *BRCA1/2* мутацій, що дозволяє з найменшими витратами забезпечувати обстеження значних популяцій людей. Найбільш поширеними є модель BOADICEA, Манчестерська бальна система (МБС), Myriad, IBIS, Penn II тощо [1, 2, 6, 7, 12]. В Україні досліджень з оцінки доцільності проведення медико-генетичного консультування з використанням алгоритмів, що передують генетичному тестуванню, не проводилося.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Результати, викладені у публікації, отримані при безпосередній участі авторів у рамках науково-дослідної роботи Державної установи «Національний науковий центр радіаційної медицини»: «Розробка рекомендацій щодо генетичного тестування схильності до розвитку раку грудної залози та медико-генетичного консультування жінок, які зазнали дії іонізуючої радіації внаслідок аварії на ЧАЕС» (№ держреєстрації 0111U000754).

**Мета:** визначити дискримінаційну здатність алгоритмів BOADICEA, Penn II, Myriad та МБС для прогнозування носійства мутацій *BRCA1* та *BRCA2* у пацієнтів з РМЗ та без нього.

### Матеріали та методи дослідження

В дослідження включено 425 осіб, серед яких 146 жінок з РМЗ та 279 практично здорових пацієнток. Пацієнти були відібрані для дослідження відповідно до принципів Гельсінської декларації після затвердження дослідження Комітетом з етики ННЦРМ НАМНУ.

Для визначення вірогідних носіїв мутацій *BRCA1* і *BRCA2*, поперше, проведено генеалогічне дослідження пробандів щодо онкологічної патології в родовах, акцентуючи увагу на випадках РМЗ та РЯ. По-друге, розраховано ризики носійства мутацій за допомогою алгоритмів BOADICEA [1], Penn II [12], Myriad [6] та Манчестерської бальної системи (МБС) [2].

По-третє, проведено молекулярно-генетичне дослідження *BRCA1* і *BRCA2* генів. Матеріалом дослідження в когорті хворих на РМЗ слугували фіксовані формаліном і залиті парафіном зразки тканини пухлини, в групі осіб без РМЗ - периферична кров. У хворих геномну ДНК виділяли з використанням набору Quiamp DNA Micro Kit (Quiagen, Hilden, Німеччина), у жінок без РМЗ за допомогою набору Nucleospin DNA Mini-Kit (Duren, Німеччина) відповідно до інструкцій виробників. Визначення мутантних алелей 5382insC і 185delAG гену *BRCA1* та 6174delT гену *BRCA2* проводили за допомогою алей-специфічної мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням умов ампліфікації ДНК і послідовності праймерів для ідентифікації цих мутацій, опублікованих Chan зі співавторами [11]. Ампліфікацію ДНК здійснювали за допомогою термоциклеру Gene-Amp PCR 2400 (Applied Biosystems, США) та реагентів GoTaq Green PCR Master Mix (Promega, США). Продукти ПЛР для візуалізації розділяли відповідно молекулярній вазі за допомогою електрофорезу у 2,5% агарозному гелі з забарвленням бромистим етидієм. Мутантні зразки підтвердженні автоматичним ферментативним секвенуванням за Сенгером на базі відділу геноміки Інституту молекулярної біології та генетики НАН України.

По-четверте, здійснено дискримінаційний аналіз моделей BOADICEA, МБС, Penn II та Myriad. Для оцінки здатності алгоритмів вірогідності носійства мутацій *BRCA1* і *BRCA2* на індивідуальному рівні відрізняти пацієнтів з мутацією та осіб без мутантних алелей були використані ROC-криві (receiver operating curves) з 95 % довірчим інтервалом (ДІ).

Ефективність роботи досліджуваних моделей оцінювали за величинами площ під кривими (ППК). Чим ближче ППК до 1, тим вище ефективність роботи алгоритму. Так, ППК 0,9-1 вказує на відмінну точність алгоритму, 0,8-0,9 - дуже гарну, 0,7-0,8 - хорошу, 0,6-0,7 - середню, 0,5-0,6 - незадовільну дискримінаційну здатність. Визначення та порівняльний аналіз ППК алгоритмів, побудову ROC-кривих проводили за допомогою статистичної програми MedCalc [8]. Операційні характеристики моделей порівнювали за допомогою точного тесту Фішера.

### Отримані результати та їх обговорення

При проведенні генеалогічного дослідження в групі хворих на РМЗ обтяжений сімейний анамнез щодо РМЗ та/або РЯ (2 та більше випадків) виявлено у 24,6% осіб: по 2 випадки даних захворювань було в 23 родин, по 3 - в 11 сім'ях, а в 2-х родин було 4 таких випадки. Крім того, 3 жінки без обтяженого сімейного анамнезу мали білатеральний РМЗ. У жінок без злоякісних пухлин молочної залози в 31 родоводі наявний, принаймні 1 випадок РМЗ та/або РЯ. Обтяжений сімейний анамнез щодо цих захворювань присутній у 1,8% (5 з 279) жінок без РМЗ.

Таблиця 1

Розподіл досліджуваних в залежності від обтяженості родоводу щодо РМЗ та/або РЯ

Особиста історія РМЗ	Сімейний анамнез щодо РМЗ та/або РЯ	BRCA-позитивні (n=11)	BRCA-негативні (n=33)
наявна	1 РМЗ або 1 РЯ	4	20
наявна	≥1 РМЗ та/або ≥1 РЯ	3	5
наявна	рак грудної залози у чоловіків	0	1
наявна	білатеральний РМЗ	1	2
білатеральний РМЗ	будь-який	1	2
відсутня	2 РМЗ	1	1
відсутня	1 РМЗ+1 РЯ	0	1
відсутня	білатеральний РМЗ	0	1
відсутня	синдром РМЗ та РЯ	1	0

При молекулярно-генетичному дослідженні генів *BRCA1/2* виявлено 7,1% (10 зі 141) мутацій серед хворих на РМЗ. У однієї жінки виявлена мутація 185delAG у гені *BRCA1*, у дев'яти - мутація 5382insC у гені *BRCA1*. Серед осіб без РМЗ знайдено 1,1% (3 з 279) мутації, усі випадки представлені алельним варіантом 5382insC. Мутації 6174delT в гені *BRCA2* не ідентифіковано в жодній із жінок.

Визначена значуща різниця по частоті мутацій між групою хворих та когортою осіб без РМЗ ( $p=0,0015$ ).

Підсумовуючи дані генеалогічного та молекулярно-генетичного досліджень, слід відзначити, що у 10 з 13 (76,9%) пацієнтів з мутаціями наявний обтяжений сімейний анамнез щодо РМЗ та/або РЯ.

Дискримінаційний аналіз моделей BOADICEA, Penn II, Myriad та МБС для прогнозування носійства мутацій *BRCA1* та *BRCA2* проведено для пацієнтів з РМЗ та без нього, родоводи яких мають білатеральний РМЗ, 2 та більше випадки РМЗ та/або РЯ. Таким чином, в розрахунок включено 44 особи: 39 хворих, серед яких 9 з мутаціями, та 5 жінок без РМЗ, поміж яких 2 з патологічними алелями (див. табл. 1).

Для візуалізації ефективності досліджуваних алгоритмів на індивідуальному рівні відрізнити осіб із наявністю та відсутністю мутантних алелей серед осіб з обтяженими родоводами відносно РМЗ та/або РЯ було побудовано ROC-криві (рис. 1).

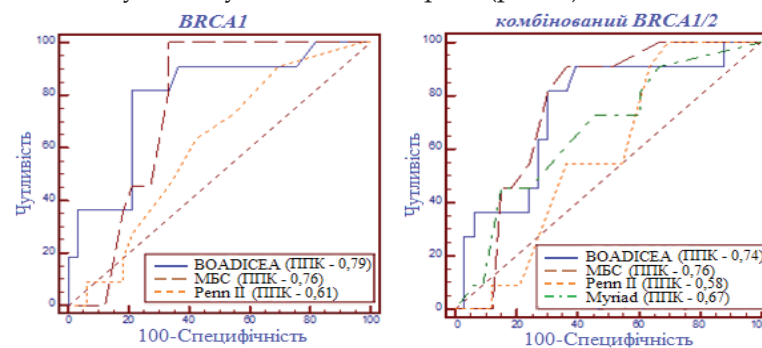


Рис. 1. ROC-криві алгоритмів щодо прогнозу *BRCA1* та *BRCA1/2* мутацій для осіб з обтяженими родоводами.

Порівнюючи ППК алгоритмів знайдено тенденцію до більшої предикативної цінності алгоритму BOADICEA порівняно з моделлю Penn II стосовно прогнозування вірогідних носіїв мутації *BRCA1* ( $p=0,0781$ ). Різниця між площинами під ROC-кривими відносно передбачення *BRCA1* патогенних алелей МБС та BOADICEA ( $p=0,6193$ ) і МБС та Penn II ( $p=0,1172$ ) не визначено. Щодо передбачення комбінованого ризику *BRCA1/2* мутацій дискримінаційна відмінність виявлена для алгоритму BOADICEA і МБС по відношенню до моделі Penn II ( $p=0,0432$  та  $p=0,0216$ , відповідно). Не знайдено різниці між ППК моделей BOADICEA та МБС ( $p=0,8540$ ), BOADICEA та Myriad ( $p=0,4883$ ), МБС та Myriad ( $p=0,2749$ ) і Penn

II та Myriad ( $p=0,3287$ ) з приводу встановлення комбінованого ризику *BRCA1/2* мутацій, що може свідчити про їх однакову дискримінаційну потужність. Для перевірки цього факту ППК кожного алгоритму було порівняно з нейтральною площею. Предикативну цінність знайдено тільки для моделі BOADICEA та МБС, як для прогнозування *BRCA1*, так і для комбінованого ризику *BRCA1/2* мутацій (табл. 2). Це свідчить про добру здатність даних алгоритмів відрізняти осіб з мутаціями та без них.

Таблиця 2

**Показники ефективності алгоритмів з 95% ДІ для осіб з обтяженими родовами щодо РМЗ та/або РЯ**

	Для прогнозу <i>BRCA1</i> мутацій			Для прогнозу комбінованого ризику <i>BRCA1/2</i> мутацій			
	BOADICEA	МБС	Penn II	BOADICEA	МБС	Penn II	Myriad
ППК	0,79 (0,65-0,90)	0,76 (0,60-0,87)	0,61 (0,45-0,75)	0,74 (0,59-0,86)	0,76 (0,61-0,88)	0,58 (0,42-0,73)	0,67 (0,51-0,80)
Стандартна помилка	0,08	0,07	0,10	0,09	0,07	0,09	0,09
p	0,0002	0,0003	0,2323	0,0054	0,0004	0,3449	0,0696
Оптимальний поріг	$\geq 6,7\%$	$\geq 6$ балів	$\geq 3\%$	$\geq 7,7\%$	$\geq 12$ балів	$\geq 7\%$	$\geq 10,4\%$
Чутливість	81,8 (48,2-97,7)	100,0 (71,5-100,0)	90,9 (58,7-99,8)	90,9 (58,7-99,8)	90,9 (58,7-99,8)	100,0 (58,7-99,8)	45,5 (16,7-76,6)
Специфічність	78,8 (61,1-91,0)	66,7 (48,2-82,0)	30,3 (15,6-48,7)	60,6 (42,1-77,1)	63,6 (45,1-79,6)	30,3 (15,6-48,7)	84,8 (68,1-94,9)
Прогностична цінність позитивного результату	56,2 (29,9-80,2)	50,0 (28,2-71,8)	30,3 (15,6-48,7)	43,5 (23,2-65,5)	45,5 (24,4-67,8)	32,4 (17,4-50,5)	50,0 (18,7-81,3)
Прогностична цінність негативного результату	92,9 (76,1-99,2)	100 (84,6-100)	90,9 (58,7-99,8)	95,2 (76,2-99,9)	95,5 (77,2-99,9)	100,0 (69,2-100,0)	82,4 (65,5-93,2)

Оптимальний предиктивний для прогнозування *BRCA1* патогенних алелей рівень алгоритму BOADICEA становить  $\geq 6,7\%$ , а

МБС -  $\geq 6$  балів. Ефективність алгоритму BOADICEA з найліпшим дискримінаційним порогом  $\geq 6,7\%$  (ППК - 0,79; 95% ДІ - 0,65-0,90,  $p=0,0002$ ) та МБС -  $\geq 6$  балів (ППК - 0,76; 95% ДІ - 0,60-0,87,  $p=0,0003$ ) для прогнозування *BRCA1* патогенних мутаційних алелей відповідають хорошему рівню. ППК алгоритму Penn II (0,61; 95% ДІ - 0,45-0,75) для прогнозу *BRCA1* мутацій свідчить на середній рівень прогностичних маркерів мутацій та не відрізняється від площі нейтральної предикативної моделі ( $p=0,2323$ ). При порівнянні операційних характеристик алгоритмів не знайдено різниці по здатності ідентифікувати носіїв *BRCA1* мутаційних алелей, проте спроможність виявляти осіб без даних мутацій моделлю BOADICEA і МБС була статистично кращою за специфічність алгоритму Penn II ( $p=0,0063$  і  $p=0,0002$ , відповідно). Це є ще одним підтвердженням того, що використання алгоритму Penn II для передбачення носіїв *BRCA1* патогенних алелей у осіб з обтяженими родовами є нераціональним.

Дискримінаційна потужність алгоритму BOADICEA (ППК - 0,74; 95% ДІ - 0,59-0,86,  $p=0,0054$ ) та МБС (0,76; 95% ДІ - 0,61-0,88,  $p=0,0004$ ) вказує на хороший ступінь передбачення комбінованого ризику *BRCA1/2* мутацій з максимально можливими операційними характеристиками при порогах  $\geq 7,7\%$  та  $\geq 12$  балів, відповідно. Площа під ROC-кривою моделі Penn II відповідає рівню незадовільних прогностичних маркерів комбінованого ризику *BRCA1/2* мутацій та не відрізняється від площі нейтральної предиктивної моделі ( $p=0,3449$ ). ППК алгоритму Myriad також не відрізняється від площі нейтрального значення ( $p=0,0696$ ). Відсутність цієї різниці унеможливило використання алгоритмів Penn II та Myriad для прогнозування комбінованого ризику *BRCA1/2* мутаційних алелей серед осіб з обтяженими родовами контрольної групи. Зіставляючи чутливість алгоритмів щодо прогнозування носійства *BRCA1/2* мутацій знайдено тенденцію до кращого виявлення *BRCA*-позитивних осіб МБС та BOADICEA по відношенню до моделі Myriad ( $p=0,0635$ ). При порівнянні передбаченої моделями кількості осіб без патологічних алелей знайдено різницю на користь алгоритму BOADICEA ( $p=0,0253$ ) та МБС ( $p=0,0130$ ) в порівнянні з Penn II. Ці дані вказують на недоцільність використання алгоритмів Penn II та Myriad для проведення дискримінаційного аналізу щодо прогнозу ризику мутацій *BRCA1/2*. Операційні характеристики моделей BOADICEA та МБС не різнилися, що вказує на однаково високу дискримінаційну їх здатність виявляти осіб з *BRCA1* і комбінованим ризиком *BRCA1/2* мутацій та без них.



На підставі результатів дослідження дискримінаційної здатності алгоритмів можемо стверджувати, що моделі BOADICEA та МБС є найбільш точними щодо прогнозування як BRCA1, так і комбінованого ризику BRCA1/2 патогенних алелей. Ці дані узгоджуються з результатами дослідження А.С. Antoniou та співавторів [9], а також аналізом, який проведено D.G. Evans та співавторами [3]. Натомість S.M Panchal зі співавторами найбільш оптимальною моделлю вважають Penn II, та наголосили, що МБС має нижчу ППК на противагу першого алгоритму, BRCAPRO, Myriad II, FHAT та Boadicea [10].

#### Висновки

1. Для тестування ризику BRCA1 та BRCA2 мутацій у хворих на РМЗ та осіб без злоскісних пухлин молочної залози з обтяженим сімейним анамнезом щодо РМЗ та/або РЯ слід використовувати модель BOADICEA та МБС.

2. Дискримінаційна здатність алгоритмів Penn II та Myriad не була доказана в когорті осіб, яка досліджувалася, що вказує на нецільність їх використання.

#### Література

1. A Beta version of the new BOADICEA Web program (BWA v3) [Electronic resource]. – Mode of access : <https://pluto.srl.cam.ac.uk/cgi-bin/bd3/v3beta1/bd.cgi>
2. Addition of pathology and biomarker information significantly improves the performance of the Manchester scoring system for BRCA1 and BRCA2 testing / D.G.R. Evans, F. Lalloo, A. Cramer [et al.] // J. Med. Genet. – 2009. – Vol. 4. – P. 811–817.
3. A new scoring system for the chances of identifying a BRCA1/2 mutation outperforms existing models including BRCAPRO / D.G. Evans, D.M. Eccles, N. Rahman [et al.] // J. Med. Genet. – 2006. – Vol. 41. – P. 474–480.
4. Average risk of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies / A. Antoniou, P.D. Pharoah, S. Narod [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2003. – Vol.72. – P.1117–1130.
5. BRCA in breast cancer: ESMO clinical recommendations practice guidelines / J. Balmaña, O. Díez, M. Rubio, M. Castiglione // Ann. Oncol. – 2010. – Vol. 21, № 5. – P. 20–22.
6. BRCA Risk Calculator [Electronic resource]. – Mode of access : <http://www.myriadtests.com/provider/bcr-mutation-prevalence.htm>
7. IBIS Breast Cancer Risk Evaluation Tool [Electronic resource]. – Mode of access : <http://www.ems-trials.org/riskevaluator/>
8. MedCalc Software [Electronic resource]. – Mode of access : <http://soft.mydiv.net/win/download-MedCalc.html>

9. Predicting the likelihood of carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation: validation of BOADICEA, BRCAPRO, IBIS, Myriad and the Manchester scoring system using data from UK genetics clinics / A.C. Antoniou, R. Hardy, L. Walker [et al.] // J. Med. Genet. – 2008. – Vol. 45, № 7. – P. 425–431.

10. Selecting a BRCA risk assessment model for use in a familial cancer clinic / S.M Panchal, M. Ennis, S. Canon, L.J. Bordeleau // BMC Med. Genet. – 2008. – Vol. 9. – P. 116.

11. Simple and Rapid Detection of BRCA1 and BRCA2 Mutations by Multiplex Mutagenically Separated PCR / P.C. Chan, B.Y. Wong, H. Ozcelik, D.E. Cole // Clinical Chemistry. – 1999. – Vol. 45, № 8. – P. 1285–1287.

12. The Penn II BRCA1 and BRCA2 mutation risk evaluation model [Electronic resource]. – Mode of access : <http://www.afcri.upenn.edu/itacc/penn2>

#### Резюме

**Рибченко Л.А., Клименко С.В.** Визначення імовірних носіїв мутацій BRCA1 та BRCA2 серед жінок з раком молочної залози та без нього.

Проаналізована дискримінаційна здатність алгоритмів BOADICEA, Penn II, Myriad та Манчестерської бальної системи щодо прогнозування ризику BRCA1 та BRCA2 мутацій у пацієнтів з РМЗ та без нього. Доказана ефективність використання моделей BOADICEA та Манчестерської бальної системи серед досліджуваної когорти осіб.

**Ключові слова:** алгоритми визначення ризику BRCA1 і BRCA2 мутацій, BOADICEA, Манчестерська бальна система, Penn II, Myriad.

#### Резюме

**Рибченко Л.А., Клименко С.В.** Определение вероятных носителей мутаций BRCA1 та BRCA2 среди женщин с раком молочной железы и без него

Проанализирована дискриминационная способность алгоритмов BOADICEA, Penn II, Myriad и Манчестерской балльной системы относительно прогнозирования риска BRCA1 и BRCA2 мутаций у пациентов с РМЖ и без него. Доказана эффективность применения моделей BOADICEA и Манчестерской балльной системы среди исследуемой когорты лиц.

**Ключевые слова:** алгоритмы определения риска BRCA1 и BRCA2 мутаций, BOADICEA, Манчестерская балльная система, Penn II, Myriad.

#### Summary

**Rybchenko L.A., Klymenko S.V.** Identification of possible carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations among women with breast cancer and healthy women.

Discriminatory ability of algorithms BOADICEA, Penn II, Myriad and the Manchester scoring system for prediction of possible carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations in patients with and without breast cancer was analyzed. The effectiveness of use of BOADICEA and Manchester scoring system was proved among the individuals of study cohort.

**Key words:** algorithms, determination the risk of BRCA1 and BRCA2 mutations, BOADICEA, Manchester scoring system, Penn II, Myriad.

**Рецензент:** д. мед. наук, проф. М.А. Пілінська