

МУТАЦІЇ В ГЕНАХ BRCA 1/2 У ЧОЛОВІКІВ УКРАЇНИ

Є.В. Городецька, С.В. Серга, А.С. Демидова, Е.О. Стаховський,
О.А. Кононенко, О.Е. Стаховський, М.В. Пікуль, І.А. Козерецька
*Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Національний інститут раку (Київ)*

Вступ

Гени *BRCA1/2* відповідають за контроль клітинного циклу, репарацію ДНК, регуляцію транскрипції та апоптоз [1]. Порушення роботи цих генів призводить до різноманітних патологій у людини, зокрема до раку молочної залози (РМЗ) у жінок, який є одним з найпоширеніших злоякісних новоутворень та основною причиною смерті від онкологічних захворювань у жінок у всьому світі [2]. Близько 10 % пацієнок з РМЗ характеризуються наявністю мутацій саме у генах *BRCA1* (BRCA1 – Breast – Cancer susceptibility gene 1) та *BRCA2* (BRCA2 – Breast – Cancer susceptibility gene 2) [3]. Ризик виникнення РМЗ у носіїв цих мутацій становить, за даними різних авторів, від 50 до 90% [4]. В літературі існують дані стосовно того, що мутації у вказаних генах також підвищують ризик захворювань на РМЗ, рак підшлункової та передміхурових залоз у чоловіків, а також про те, що перебіг хвороби у носіїв генів *BRCA1/2* є більш ускладненим [5]. В Україні мутації генів *BRCA1/2* вивчалися лише у жінок [6, 7], а ситуація з захворюваннями, пов'язаними з порушенням роботи цих генів у чоловіків залишається майже не дослідженою [4, 8].

Метою даної роботи було відпрацювання методик та початковий аналіз частоти мутацій у генах *BRCA1/2* у чоловіків з захворюванням на рак передміхурової залози (РПЗ), як форми захворювання, для якої показано зв'язок з мутаціями в генах *BRCA1/2* [9, 10], та в контрольній групі потенційно здорових чоловіків.

Матеріали та методи дослідження

У дослідження були залучені 15 чоловіків, хворих на рак передміхурової залози та 15 потенційно здорових чоловіків того ж віку. Вік чоловіків становив від 59 до 75 років. Для виділення геномної ДНК використовувалася периферійна кров, яку зберігали не більше доби. До свіжої крові додавали розчин ЕДТА (етилендіамінте-

траоцтова кислота) у кількості 100 мкл 3% розчину на 1 мл крові та залишали на +4 °C у холодильнику. Виділення ДНК проводили фенольним методом за стандартним протоколом. Наявність двох мутацій гену *BRCA1* (185delAG, 5382insC) та однієї мутації в гені *BRCA2* (6174delT) визначали методом мультипраймерної ПЛР з використанням специфічних праймерів [11]. Для кожної мутації використовували по три праймера (один – загальний, один специфічний для мутації та один специфічний для алеля дикого типу). Послідовності праймерів, використані у відповідності до літературних даних [11], та розміри відповідних ампліфікованих фрагментів наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Використані у експерименті праймери

Праймер	Послідовність праймера	Розмір ампліфікованих фрагментів
BRCA1 – 185delAG Загальний праймер (P1) Специфічний для алеля дикого типу (P2) Специфічний для мутації (P3)	5'-ggttgccagcaatatgtgaa	335 пн 354 пн
	5'-gctgacttaccagatgggactctc	
	5'-cccaaattaatacactcttgcgtgactaccagatgggacagta	
BRCA1 – 5382insC Загальний праймер (P4) Специфічний для алеля дикого типу (P5) Специфічний для мутації (P6)	5'-gacgggaatccaaattacacag	271 пн 295 пн
	5'-aaagcagcaagagaatcgca	
	5'-aatcgaagaaccaccaaagtcttagcagcaagagaatcacc	
BRCA2 – 6174delT Загальний праймер (P7) Специфічний для алеля дикого типу (P8) Специфічний для мутації (P9)	5'-agctggctctgaatgttcgttact	151 пн 171 пн
	5'-gtgggatttttagcacagctagt	
	5'-cagtctcatctgcaatacttcaggatttttagcacagcatgg	

ПЛР проводили за схемою наведеною в літературі [11] з власною оптимізацією: 3 хв при 95°C, 35 циклів, кожен з яких включав по 30 с при 94°C, 40 с при 57°C та 30 с при 72°C, а кінцева стадія елонгації 5 хв при 72 ° C. Реакція проводилась у суміші 20 мкл (3 мкл ге-

номної ДНК, 2 мкл 10x ПЛР-буферу (10X DreamTaq Buffer, «Thermo Scientific», USA), 2 мкл 2 mM dNTP («Thermo Scientific», USA), 3 мкл 20 mM праймерів P1 та P3, 1 мкл 20 mM праймера P2, 0,25 мкл 20 mM праймерів P4, P5 та P6, 0,7 мкл 20 mM праймерів P7 та P9, 0,6 мкл 20 mM праймера P8, 1 мкл Taq-полімерази (1 од.акт/мкл «Thermo Scientific», USA), 3 мкл дистильованої води), яка готувалася для всіх проб разом, а вже потім додавалася ДНК.

Після ПЛР 4 мкл суміші з продуктами реакції переносили на 8% поліакриламідний гель (6,5 мл дистильованої води, 2,7 мл поліакриламідну (29 г акриламідну, 1 г бісакриламідну, 100 мл дистильованої води), 1 мл 10xTBE (108 г Tris base, 55 г борної кислоти, 40 мкл 0.5M EDTA), 70 мкл 10% персульфата амонія та 15 мкл TEMED (тетраметилетилендіамін). Сила струму становила 35 mA, а напруга 190 В.

Отримані результати та їх обговорення

РПЗ є другою найбільш поширеною формою раку у чоловіків у всьому світі та займає шосте місце серед найпоширеніших причин смерті [12].

В результаті аналізу ДНК 15 хворих на рак передміхурової залози та 15 умовно здорових чоловіків з контрольної групи, в жодній з досліджених нами проб, мутацій 185delAG, 5382insC в гені *BRCA1* та мутації 6174delT в гені *BRCA2* не були виявлені (рис.1).

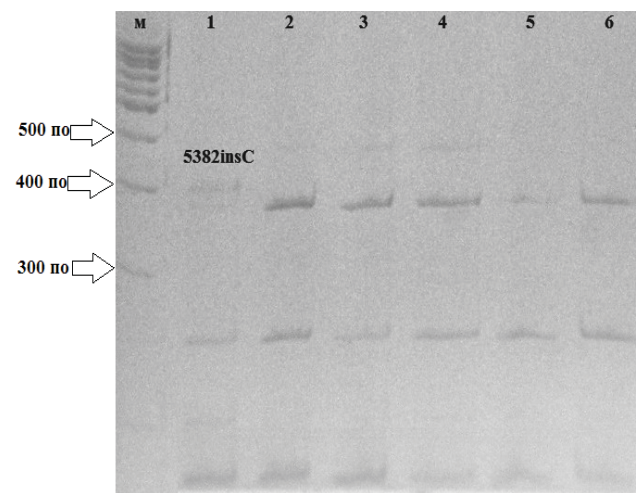


Рис 1. Приклад електрофореграми результатів ПЛР (м – маркер GeneRuler 100bp («Thermo Scientific», USA), 1 – контрольний зразок з мутацією 5382insC, 2-6 – ДНК хворих на рак передміхурової залози).

Результати дослідження частоти мутацій в генах *BRCA1/2* у світі демонструють, що серед 2481 продіагностованих учасників з 62 центрів, 20 країн світу, було виявлено 791 пацієнт, що мали мутації гену *BRCA1* та 531 пацієнт з мутаціями в гені *BRCA1* серед контрольних зразків, а також 731 чоловік, які мали *BRCA2* мутації та 428 пацієнтів, що мали мутації *BRCA2* серед контрольних зразків [12]. Частота виявлення РПЗ склала відповідно 2,4% (59 з 2481 чоловіків). Частота виявлення мутацій для гену для *BRCA1* склала 2,3% (18 з 791) серед хворих на РПЗ та 1,9% (10 з 531) серед контрольних зразків, а для гену *BRCA2* – 3,3% (24 з 731) для пацієнтів з РПЗ та 1,6% (7 з 428) для контролів. Беручи до уваги географічну мінливість в захворюваності на рак, дані аналізувалися по таких регіонах, як Північна Америка, Австралія, Азія, а також Західна, Центральна та Південна Європа, при цьому не було виявлено статистично значущих відмінностей [12]. Також, наприклад, в США шляхом секвенування ділянок інтронеонів в гені *BRCA2* були продіагностовані наявність мутацій 290 пацієнтів з округу Кінг, штату Вашингтон, в 2 були виявлені мутації в 11 екзоні гену *BRCA2*, що складає 0,6% [13]. В Великобританії серед 38 діагностованих випадків сімейного РПЗ були виявлені дві мутації в гені *BRCA2* та жодної в гені *BRCA1*, що становить 5% [14]. Виходячи з вищезазначених частот, відібрані нами для аналізу групи є вкрай малочисельними для отримання відповідного результату. Оскільки, як було вказано [5], мутації в генах *BRCA1/2* пов'язані у чоловіків не тільки з РПЗ, а також і з іншими поширеними формами раку, проведення дослідження з залученням достатньо великої вибірки пацієнтів з оглядом на встановлені частоти цих подій в інших регіонах світу [12], дозволить як з'ясувати частоти таких подій в Україні загалом, так і передбачити перспективи лікування конкретного пацієнта зокрема.

Висновки

Серед продіагностованих нами проб не було виявлено жодної мутації в генах *BRCA1* та *BRCA2* у пацієнтів хворих на РПЗ та в контрольній групі, що пов'язано з низькою частотою цих мутацій в популяціях людини.

Література

1. Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins / S.J. Boulton // *Biochemical Society Transactions*. - 2006. - Vol. № 34. - P. 633-645.
2. Breast cancer stem cells: multiple capacities in tumor metastasis / S.Q. Geng, A.T. Alexandrou, J.J. Li [Electronic resource] // *Cancer Letters*. - 2014. - Vol. 12. - Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24727284>

3. Fentiman I.S. Male breast cancer / I.S. Fentiman, A. Fourquet, G.N. Hortobagyi // *The Lancet*. - 2006. - Vol. 367. - P. 595-604.
4. BRCA1 and BRCA2 hereditary breast/ovarian cancer [Electronic resource] / N. Petrucelli, M.B. Daly, J. Culver [et al.] // *Medical Genetics Information Resource (online database)*. - 2005. - Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247/>
5. Outcome of male breast cancer: a matched single-institution series / M. Iorfida, V. Bagnardi, N. Rotmensz [et al.] [Electronic resource] // *Clinical Chemistry*. - 2014. - Vol. 14. - Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Breast+cancer+%2F+M.+Iorfida%2C+V.+Bagnardi%2C+N.+Rotmensz+%2F%2F+Clinical+Chemistry>
6. Breast cancer immunohistochemical features in young women with BRCA 1/2 mutations / L. M. Zakhartseva, N. G. Gorovenko, S. V. Podolskaya [et al.] // *Experimental oncology*. - 2009. - Vol. 31. - P. 174-186.
7. Аналіз мутацій у генах *BRCA1/2* у хворих на сімейний/спадковий рак молочної залози, які проживають у львівській області (Україна) / Б. Т. Білинський, Н. О. Лукавецький [et al.] // *Онкологія*. - 2012. - Т. 1, № 14. - С. 44-48.
8. Національний канцер-реєстр Національного Інституту Раку / 2011-2012 рр. - Випуск № 14.
9. Thompson D. Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers / D. Thompson, D. F. Easton // *Journal of the National Cancer Institute*. - 2002. - Vol. 94. - P. 1358-1365.
10. Cancer variation associated with the position of the mutation in the BRCA2 gene / J. Lubinski, C. M. Phelan, P. Ghadirian [et al.] // *Familial Cancer*. - 2004. - Vol. 3. - P. 1-10.
11. Simple and rapid detection of BRCA1 and BRCA2 Mutations by multiplex mutagenically separated PCR / P.C. Chan, B.Y. Wong, H. Ozcelik [et al.] // *Clinical Chemistry*. - 1999. - Vol. 45. - P. 1285-1287.
12. Targeted prostate cancer screening in BRCA1 and BRCA2 Mutation carriers: results from the initial screening round of the IMPACT study / E.K. Bancroft, E.C. Page, E. Castro [et al.] // *European urology*. - 2014. - Vol. 65. - P. 0302-2838.
13. Rare germline mutations in the BRCA2 gene are associated with early-onset prostate cancer / I. Agalliu, E. Karlins, E. M. Kwon [et al.] // *British Journal of Cancer*. - 2007. - Vol. 97. - P. 826-831.
14. The frequency of germ-line mutations in the breast cancer predisposition genes BRCA1 and BRCA2 in familial prostate cancer / S.A. Gayther, K.A. de Foy, P. Harrington [et al.] // *Cancer Research*. - 2000. - Vol. 60. - P. 2115-2121.

Резюме

Городецька Є.В., Серга С.В., Демидова А.С., Стаховський Е.О., Кононенко О.А., Стаховський О.Е., Пікуль М.В., Козерецька І.А. Мутації в генах *BRCA1/2* у чоловіків України.

Мутації в генах *BRCA1/2* підвищують ризик захворювань на рак молочної залози, рак підшлункової та передміхурових залоз у чоловіків. В Україні мутації генів *BRCA1/2* вивчалися лише у жінок, а ситуація з захворюваннями, пов'язаними з порушенням роботи цих генів у чоловіків залишається майже не дослідженою. Аналіз 15 чоловіків, хворих на рак передміхурової залози та 15 потенційно здорових чоловіків того ж віку на наявність двох мутацій гену *BRCA1* (185delAG, 5382insC) та однієї мутації в гені *BRCA2* (6174delT) проводили методом мультипраймерної ПЛР. Жоден з проаналізованих пацієнтів не характеризувався наявністю вказаних мутацій, що відповідає даним літератури, які свідчать про низьку частоту цієї події у чоловіків Північної Америки, Австралії, Азії, а також Західної, Центральної та Південної Європи.

Ключові слова: *BRCA1* та *BRCA2*, мутації, рак молочної залози, рак передміхурової залози.

Резюме

Городецкая Е.В., Серга С.В., Демидова А.С., Стаховский Э.О., Кононенко О.А., Стаховский О.Э., Пиккуль М.В., Козерецька И.А. Мутации в генах *BRCA1/2* у мужчин Украины.

Мутации в генах *BRCA1/2* повышают риск возникновения рака молочной железы, рака поджелудочной и предстательной желез у мужчин. В Украине мутации генов *BRCA1/2* изучались только у женщин, а ситуация с данными заболеваниями, связанными с нарушением работы этих генов у мужчин остается почти не исследовано. Анализ 15 мужчин, больных раком предстательной железы и 15 потенциально здоровых мужчин того же возраста на наличие двух мутаций гена *BRCA1* (185delAG, 5382insC) и одной мутации в гене *BRCA2* (6174delT) проводили методом мультипраймерной ПЦР. Ни один из проанализированных пациентов не характеризовался наличием указанных мутаций, что соответствует данным литературы, которые свидетельствуют о низкой частоте этого события у мужчин Северной Америки, Австралии, Азии, а также Западной, Центральной и Южной Европы.

Ключевые слова: *BRCA1* и *BRCA2*, мутации, рак молочной железы, рак предстательной железы.

Summary

Gorodetska I.V., Serga S.V., Demidova A.S., Stakhovsky E.O., Kononenko A.A., Stakhovsky O.E., Pikul M.V., Kozeretska I.A. Mutations in *BRCA 1/2* in male from Ukraine.

Mutations in *BRCA1/2* genes are known to increase the risk of human breast cancer, pancreatic cancer and prostate cancer. In Ukraine only mutations in woman *BRCA1/2* were studied, thus the situation with these diseases related to disturbance of these genes in ukrainian men remains poorly explored. We performed PCR analysis on 15 men with prostate cancer and 15 potentially healthy men of the same age in order to detect presence of two mutations in *BRCA1* gene (185delAG, 5382insC) and one mutation in *BRCA2* gene (6174delT). None of the analyzed patients demonstrated the presence of these mutations, which accords to the literature data that specify a low frequency of this event in men in North America, Australia, Asia, and the Western, Central and Southern Europe.

Keywords: *BRCA1* and *BRCA2*, mutations, breast cancer, prostate cancer.

Рецензент: д.біол. н., проф. С.В. Демидов

УДК 576.858

БІОЛОГІЯ ГЕРПЕСВІРУСІВ РИБ

М.І. Майстренко, Л.П. Буцацький

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Вступ

Назва герпесвірусів походить від грецького слова *herpes*, що в перекладі означає «повзучий». Вони широко розповсюджені в природі – наразі відомо понад 130 різних герпесвірусів тварин. Найбільше їх ізольовано з вищих хребетних та з людини, лише декілька герпесвірусів ізольовано з амфібій, та один із молосків (*Ostreavirus*, родина *Malacoherpesviridae*). Серед вищих еукаріот рідко зустрічаються тварини, які б не були вражені цими вірусами. Серед герпесвірусів тварин зустрічаються також такі віруси як вірус хвороби Марека та вірус Люке, які здатні викликати канцерогенз. Біологічні властивості не всіх герпесвірусів є однаковими. Наприклад, існують герпесвіруси з широким спектром хазяїв, які швидко руйнують клітини хазяїна, інші мають вузький спектр хазяїв. Багато з герпесвірусів тварин та людини здатні утворювати латентні інфекції і довго співіснувати з організмом свого хазяїна. Всі герпесвіруси вищих еукаріот (родина *Herpesviridae*) за останньою класифікацією відносяться до трьох підродин: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* та *Gammaherpesvirinae*. Всі герпесвіруси риб відносяться до родини *Alloherpesviridae*. До цієї родини відносяться такі роди: Рід *Batrachovirus*; Рід *Cyprinivirus*; Рід *Ictalurivirus*; Рід *Salmonivirus*.

Герпесвіруси риб завдають значної шкоди рибництву. Відомо 15 герпесвірусів, які здатні викликати значні патологічні зміни в організмі риб (таблиця 1, №№ 1-15). Серед них найбільш відомими є герпесвірус кої, вірус віспи коропа, герпесвірус каналного сома, герпесвірус *Oncorhynchus masou*. Крім них, відомі і інші герпесвіруси риб, які були виявлені лише за допомогою електронної мікроскопії, але завдяки їхній високій видовій специфічності для цих вірусів ще не розроблені методи накопичення на перевивних культурах клітин, тому не вивчені їх біологічні властивості (табл. 1, № 16-27).

1. Біологічна характеристика герпесвірусів риб.

Аллогерпесвіруси риб за біологічними ознаками подібні до герпесвірусів вищих хребетних та людини. Вони володіють високою