

АНАЛИЗ ВСТРЕЧАЕМОСТИ МУТАЦИИ 5382INSC В ГЕНЕ *BRCA1* У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ В СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ

М.С. Анисименко¹, Н.А. Афанасьева², О.Б. Часовникова¹,
С.Э. Красильников², Л.Ф. Гуляева^{1,3}, С.П. Коваленко^{1,3}

*НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, г. Новосибирск¹
Государственный областной онкологический диспансер, г. Новосибирск²
Новосибирский государственный университет³
630117, г. Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2, e-mail: olchasov@mail.ru¹*

Проведено генотипирование 97 образцов ДНК больных раком яичников. Из общего числа пациенток 4 женщины (4,1 %) оказались носителями мутации 5382insC в гетерозиготном состоянии. Наследственная отягощенность (семейная история по данному заболеванию) у носителей мутации была зафиксирована в одном случае. Выявление данной мутации у здоровых женщин важно для ранней диагностики заболевания, а у больных женщин-носительниц мутации – для персонализированного лечения.

Ключевые слова: рак яичников, мутации 5382insC гена *BRCA1*.

THE INCIDENCE OF MUTATION *BRCA1* 5382INSC IN OVARIAN CANCER PATIENTS IN SIBERIAN REGION, RUSSIA

M.S. Anisimenko¹, N.A. Afanasieva², O.B. Chasovnikova¹, S.E. Krasilnikov², L.F. Gulyaeva^{1,3}, S.P. Kovalenko^{1,3}

Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, SD RAMS, Novosibirsk¹

State Regional Oncology Dispensary, Novosibirsk²

Novosibirsk State University, Novosibirsk³

2, Timakova Street, 630117-Novosibirsk, Russia, e-mail: olchasov@mail.ru¹

Insertion 5382insC in *BRCA1* gene is the most frequent mutation associated with high risk of ovarian cancer in women of the East Europe population. Genotyping of 97 DNA samples of patients with the diagnosis «ovarian cancer» was carried out. From the total number of patients 4 women (4,1 %) had mutation 5382insC in a heterozygote state. Hereditary form of ovarian cancer (the family history of the given disease) has been fixed only in one case. Identification of the given mutation in healthy women is important for the early diagnostics of ovarian and breast cancers, whereas among patients it is important for the personalized treatment.

Key words: ovarian cancer, mutation 5382insC in *BRCA1* gene.

Рак яичников (РЯ) – частое онкогинекологическое заболевание, которое занимает лидирующие позиции по смертности, в основном вследствие несовершенства ранней диагностики [9]. В России показатель заболеваемости раком яичника (16,5 случая на 100 000 женского населения) и смертности (10,0 случаев на 100 000 женского населения) выше, чем в странах Европейского Союза (14,1 и 8,0 соответственно) [2]. По Новосибирской области в 2010 г., согласно ежегодному отчету областного онкологического диспансера, показатели заболеваемости РЯ и смертности от этой патологии равны 15,8 случая и 10,7 случая на 100 000 женского населения. При этом на рак яичников IV стадии приходится более 25 % впервые выявленных случаев. Общеизвестно, что до 10 % наблюдений РЯ являются наследственными [11], из них, по данным литературы, до 30–40 %

обусловлены мутациями, наследуемыми по аутосомно-доминантному признаку, в генах *BRCA1* (MIN 113705) и *BRCA2* (MIN 600185), локализованных соответственно на хромосомах 17q21 и 13q12, причем на долю гена *BRCA1* приходится до 80 % всех мутаций [12]. Доказано, что инактивирующие мутации в гене *BRCA1* проявляют высокую пенетрантность и приводят к развитию РЯ с вероятностью до 50 % в течение жизни женщины [8]. Одной из наиболее часто встречающихся мутаций гена *BRCA1* у женщин восточноевропейского происхождения является мутация 5382insC, которая приводит к сдвигу рамки считывания и формированию преждевременного стоп-кодона, что, в конечном итоге, приводит к синтезу укороченного «дефектного» белка и сопровождается нарушением его функциональных свойств [14].

Учитывая высокую частоту встречаемости носителей мутации 5382insC гена *BRCA1* среди больных РЯ, вполне закономерно ставить вопрос о необходимости анализа наличия этой мутации у всех больных с диагнозом РЯ, а также о необходимости тщательного наблюдения всех носителей *BRCA1* мутаций врачами-онкологами. Для планирования таких мероприятий необходима информация о распространенности мутаций для каждого региона России, так как известно, что частоты встречаемости мутаций могут сильно варьировать от региона к региону.

Целью исследования является анализ распространенности мутации 5382insC в гене *BRCA1* среди жительниц Сибирского региона с диагнозом рак яичников.

Материал и методы

В работе использовали образцы крови (97 образцов) пациенток с диагнозом рак яичников, которые проходили стационарное лечение в гинекологическом отделении Новосибирского областного онкодиспансера, в период с 2005 по 2010 г. Диагноз РЯ был установлен согласно критериям гистологической классификации опухолей яичников ВОЗ. Возраст пациенток варьировал от 15 до 77 лет, средний возраст – $51 \pm 12,2$ года. Все больные дали информированное согласие на проведение настоящего исследования. Исследования соответствовали этическим стандартам биоэтического комитета НИИМББ СО РАМН, разработанным в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками (2000) и «Правилами клинической практики в РФ», утвержденными Приказом № 266 Минздрава РФ от 19.06.03.

Геномную ДНК выделяли из 100 мкл периферической крови с использованием набора «Wizard Genomic DNA Purification Kit» (Promega, США). Выделение проводили согласно рекомендациям производителя. Определение концентрации ДНК в образцах производили на приборе «NanoDrop» (Thermo Scientific, США).

Для детекции мутации 5382insC в гене *BRCA1* использовали флуоресцентно-меченные олигонуклеотиды по технологии «дуплекс-антипраймер» [18]. Стандартные олигонуклеотиды и олигонуклеотиды, несущие 6-карбоксифлуоресцеин (FAM), а также тушитель флуоресценции BHQ-1

(Black Hole Quencher Type 1) были синтезированы фирмой «Лаборатория Медиген» (Новосибирск). Использованы следующие структуры общего и дискриминирующих праймеров:

Общий: 5'-TTATGTGGTTGGGATGGAAGAG,
W: 5'-FAM-AGTGCTATCCGAGGGAACAAAG
CGAGCAAGAGAATCCTAG,
M: 5'-FAM-AGTGCTATCCGAGGGAAAAAGC
GAGCAAGAGAATCCTCA.

Выявление аллельных вариантов исследуемого гена с использованием ПЦР в режиме «реального времени» проводили с использованием термоциклера IQ5 (BioRad, США) в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 67 mM Tris-HCl (pH 8,8); 0,01 % Твин 20; 0,32 mM каждого dNTP; 800 nM олигонуклеотида AP (5'-TTCCTCGGATAGCACT-BHQ1); 400 nM общего и дискриминирующего праймеров, 5–10 нг геномной ДНК и 1 ед. Smart Taq ДНК-полимеразы. Детекцию мутации 5382insC гена *BRCA1* проводили в присутствии 3 mM MgCl_2 при следующих условиях: начальная денатурация 5 мин при 94°C, далее 40 циклов: 10 с при 94°C, 15 с при 61,0°C, 25 с при 72°C, 15 с при 50°C с регистрацией уровня флуоресценции FAM.

Использованные реагенты были предоставлены ООО «Лаборатория Медиген» (Новосибирск).

Результаты и обсуждение

В 2009–2010 гг. в Институте молекулярной биологии и медицины СО РАМН с использованием метода пулирования была проанализирована крупномасштабная выборка образцов ДНК жителей города Новосибирска. Из 7920 образцов ДНК было выявлено 20 образцов, гетерозиготных по мутации *BRCA1* 5382insC (0,25 %) [1].

В настоящей работе был проведен анализ встречаемости мутации *BRCA1* 5382insC у женщин, больных РЯ. Выборка была сформирована без учета семейной истории заболевания. Из 97 образцов ДНК, выделенных из крови пациенток с диагнозом «рак яичников», было выявлено 4 образца, гетерозиготных по мутации *BRCA1* 5382insC (4,1 %). Полученные данные демонстрируют повышенную частоту встречаемости носителей мутации 5382insC в гене *BRCA1* среди больных с диагнозом «рак яичников» по сравнению с группой сравнения (4,1 % против 0,25 %).

В настоящее время выявление носительниц мутаций в гене *BRCA1* в России ведется лишь в

нескольких центрах. Онкогенетические подразделения созданы в Москве (РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН и Городская онкологическая больница № 62), в Санкт-Петербурге (НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова) и в Томском НИИ онкологии СО РАМН. Поэтому исследования спектра мутаций, частоты встречаемости той или иной мутации в России находятся на начальном этапе. Отметим следует, что частота встречаемости носителей мутации *BRCA1* 5382insC среди больных РЯ по Сибирскому региону оказалась ниже, по сравнению с другими регионами Российской Федерации.

Так, например, в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарда (Москва) с использованием технологии биочипов проведено исследование частоты встречаемости семи мутаций в генах *BRCA1/2* у российских женщин с диагнозом РЯ. Было протестировано 68 пациенток с органоспецифическим РЯ и обнаружено 7 случаев мутаций в гене *BRCA1* (10,3 %), из которых шесть больных являлись носительницами мутации 5382insC. Таким образом, процент носителей этой мутации в гене *BRCA1* среди пациенток с диагнозом РЯ составил 8,82 %. По мнению авторов, мутация *BRCA1* 5382insC является наиболее часто встречающейся у больных органоспецифическим РЯ, так как составляет 87,5 % от всех выявленных мутаций в этом гене [10].

В 2007 г. опубликованы результаты исследования частоты встречаемости мутаций в генах *BRCA1/2* при РЯ (обследовано 74 пациентки), проведенного на базе Медико-генетического научного центра сотрудниками РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (Москва). В выборке, образованной без учета семейного анамнеза, носителями мутаций в гене *BRCA1* оказались 12 женщин, больных РЯ. Таким образом, встречаемость мутаций в гене *BRCA1* у больных РЯ в российской популяции по результатам проведенного исследования составляет 16 %. Показано, что в спектре мутаций гена *BRCA1* преобладает мутация 20-го экзона – 5382insC. Согласно опубликованным результатам, данная мутация встречается у больных РЯ в 9,5 % [7].

При генотипировании образцов ДНК, выделенных из крови больных РЯ, для которых была выявлена положительная семейная предрасположенность по данному заболеванию, мутации в гене *BRCA1* были обнаружены во всех случаях. Мутация 5382insC была определена в 60 % [3].

В 2009 г. опубликованы результаты исследования

роли ряда мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* и *NBS1* в формировании наследственной предрасположенности к РЯ у жительниц Северо-Западного региона РФ. На базе НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова (Санкт-Петербург) на основании диагноза РЯ, без учета семейной истории заболевания были отобраны 209 пациенток, которые были подвергнуты генетическому тестированию. Более 90 % обнаруженных мутаций (33/209) были локализованы в гене *BRCA1*. До 85 % всех мутаций данного гена приходится на долю мутации *BRCA1* 5382insC (28 из 33). Согласно опубликованным результатам, данная мутация встречается в гетерозиготном состоянии у 9,7 % больных РЯ [17].

Подобное исследование было проведено и для жительниц южного региона России. На базе Краевого онкологического диспансера (Краснодар) случайным образом были отобраны 188 больных РЯ, которые были подвергнуты генетическому тестированию. Частота встречаемости мутации *BRCA1* 5382insC для данной популяции оказалась практически вдвое выше – 19,2 %. Также были обследованы 54 родственницы пациенток-носителей мутации *BRCA1* 5382insC. Мутация была выявлена у 6 человек – 11 %. Все женщины находились под тщательным наблюдением. В течение 34 мес с момента начала мониторинга у 2 носительниц были диагностированы злокачественные новообразования и ещё у двух выявлены фоновые и предраковые заболевания органов женской репродуктивной системы. Таким образом, результаты данной работы свидетельствуют о целесообразности скрининга больных РЯ на наличие мутации *BRCA1* 5382insC [5].

Следует отметить, что семейная история РЯ обнаруживается далеко не у всех больных с мутацией в генах *BRCA1/2*. Частота встречаемости семейных случаев варьирует для выборок из разных популяций от 47 % [13] до 94 %. [15]. Различия частот могут быть, по-видимому, обусловлены особенностями конкретной выборки

В настоящем исследовании при ретроспективном анализе наличия наследственной отягощенности у больных РЯ семейная история была зафиксирована лишь в одном случае. Нам удалось построить родословную семьи с носителями мутации 5382insC в гене *BRCA1*. Так как родословная строилась со слов ныне живущих носительниц мутации, выявить ее у умерших предков не представлялось возможным. Однако по наследованию этой мутации у современных по-

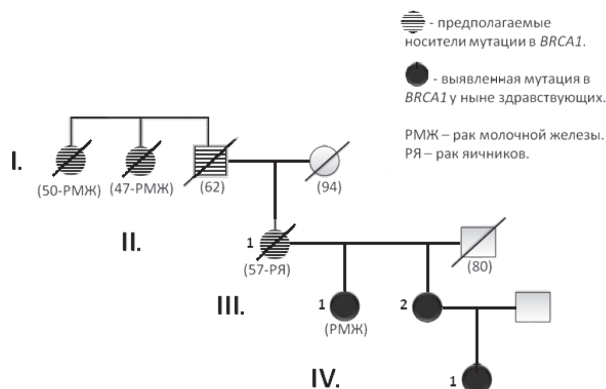


Рис. 1. Родословная семьи с мутацией BRCA1 5382insC

томков мы можем с высокой степенью вероятности предположить наличие этой мутации у предков. У женщины [III-1] в 48-летнем возрасте была обнаружена инвазивная протоковая карцинома Па. Ее мать [II-1] в 57 лет была оперирована по поводу аденокарциномы яичников IV стадии. Больной [III-1] и ее сестре [III-2] было проведено ДНК-тестирование в лаборатории ДНК-диагностики ООО «Биолинк» г. Новосибирска и выявлена мутация *BRCA1* 5382insC. Племянница [IV-1] также явилась носителем данной мутации (рис. 1).

Представленный случай показывает необходимость выявления подобных мутаций в семьях, где были зафиксированы случаи РЯ или РМЖ. Наличие семейной отягощенности по этим заболеваниям должно насторожить врача-онколога и явиться основанием для проведения ДНК-диагностики наследственных форм злокачественных новообразований не столько для пациентов, сколько для их практически здоровых родственников, у которых еще не возникла опухолевая патология. Женщины, являющиеся носительницами мутаций в генах *BRCA1/2*, должны проходить тщательный скрининг для раннего обнаружения рака яичников и молочных желез. Диагностика генетической предрасположенности к развитию злокачественных новообразований исключительно важна, так как осведомленность о высоком риске онкологической патологии позволяет правильно организовать медицинское наблюдение и предотвратить неблагоприятный исход заболевания [4]. Наряду с ранней диагностикой заболевания выявление носительниц инактивирующих мутаций в генах *BRCA1/2* играет важную роль в персонализированном лечении таких

больных препаратами платины и ингибиторами PARP1 [6, 16].

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013гг, НК-543П, №П600.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисименко М.С., Часовникова О.Б., Митрофанов Д.В. и др. Распространенность онкологически значимых мутаций среди жителей г. Новосибирска // Сб. науч. трудов «Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике». Новосибирск, 2010. С. 143–149.
2. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2007 г. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2009. Т. 20, № 3с. С. 8–156.
3. Логинова А.Н., Поспехова Н.И., Любченко Л.Н. и др. Спектр мутаций в гене *BRCA1* при наследственной предрасположенности к раку молочной железы и яичников в российских семьях // Бюллетень экспериментальной биологии. 2003. Т. 136 (9). С. 315–317.
4. Паяниди Ю.Г., Сельчук В.Ю., Жордания К.И. и др. Первично-множественные злокачественные новообразования половых органов у женщин: пути профилактики // Опухоли женской репродуктивной системы. 2010. № 1. С. 51–54.
5. Порханова Н.В., Ткаченко Н.Н., Соколенко А.П. и др. Роль генетического скрининга в профилактике рака яичника // Сибирский онкологический журнал. 2009. Прил. № 2. С. 163–164.
6. Семиглазов В.Ф., Дашян Г.А., Семиглазов В.В. и др. Таргетная терапия рака молочной железы (новые направления) // Фарматека. 2011. № 7. С. 14–20.
7. Смирнова Т.Ю., Поспехова Н.И., Любченко Л.Н. и др. Высокая частота мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* при раке яичников // Бюллетень экспериментальной биологии. 2007. Т. 144 (7). С. 93–95.
8. Antoniou A., Pharoah P.D., Narod S. et al. Average risks 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 // Am. J. Hum. Genet. 2003. Vol. 72 (5). P. 1117–1130.
9. Bradford P.W. Gynecologic Malignancies // Surg. Clin. N. Am. 2008. Vol. 88. P. 301–317.
10. Fedorova O.E., Lyubchenko L.N., Payanidi Yu.G. et al. Biochip Analysis of *BRCA1/2* and *CHEK2* Common Mutations in Ovarian Cancer and Primary Multiple Tumors Involving the Ovaries (Russian Population) // Mol. Biol. 2007. Vol. 41 (1). P. 32–36.
11. Gevensleben H., Serçe N., Büttner R. Hereditary breast and ovarian cancers // Pathologie. 2010. Vol. 31 (6). P. 438–444.
12. Lux M.P., Fasching P.A., Beckmann M.W. Hereditary breast and ovarian cancer: review and future perspectives // J. Mol. Med. (Berl). 2006. Vol. 84 (1). P. 16–28.
13. Majdak E.J., Debnjak J., Milczek T. et al. Prognostic impact of *BRCA1* pathogenic and *BRCA1/BRCA2* unclassified variant mutations in patients with ovarian carcinoma // Cancer. 2005. Vol. 104 (5). P. 1004–1012.
14. Neuhausen S.L. Founder populations and their uses for breast cancer genetics // Breast Cancer Res. 2000. Vol. 2. P. 77–81.
15. Risch H.A., McLaughlin J.R., Cole D.E. et al. Prevalence and penetrance of germline *BRCA1* and *BRCA2* mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer // Am. J. Hum. Genet. 2001. Vol. 68 (3). P. 700–710.
16. Sessa C. Update on PARP1 inhibitors in ovarian cancer // Ann. Oncol. 2011. Vol. 22, S. 8. P. 72–76.
17. Susptsin E.N., Sherina N.Y., Ponomariova D.N. et al. High frequency of *BRCA1*, but not *CHEK2* or *NBS1* (NBN), founder mutations in Russian ovarian cancer patients // Hered. Cancer Clin. Pract. 2009. Vol. 7 (1). P. 5.
18. Yang L., Liang W., Jiang L. et al. A novel universal real-time PCR system using the attached universal duplex probes for quantitative analysis of nucleic acids // BMC Mol. Biol. 2008. Vol. 9. P. 54–66.

Поступила 4.02.12