

УДК 618.19–006.4–07:575

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.1.44–47

Рак молочной железы: риск-ассоциированные мутации гена *BRCA1* для скрининга жителей Приморья

И.С. Гулян¹, Н.Ю. Чернышева^{2,3}, А.М. Стенкова^{2,3}, В.И. Невожай¹, М.П. Исаева^{2,3}¹ Тихоокеанский государственный медицинский университет (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),² Дальневосточный федеральный университет (690091, г. Владивосток, ул. Суханова, 8), ³ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН (690022, г. Владивосток, пр-т 100-лет Владивостоку, 159)

Обследованы 107 женщин с раком молочной железы в возрасте от 23 до 79 лет. Методом прямого секвенирования шести прогностически важных участков гена *BRCA1* были выявлены его пять риск-ассоциированных полиморфизмов: инсерция 5382insC (rs80357906), миссенс-вариант Q356R (rs1799950), миссенс-вариант C61G (T300G, rs28897672), делеция 3819del5 с преждевременным стоп-кодоном (rs80357609) и делеция 4154delA со сдвигом рамки считывания (rs80357711). Информация о региональном спектре мутаций *BRCA1* позволит разработать методы для быстрого тестирования, диагностирования и формирования групп риска, а также профилактики РМЖ среди здоровых женщин – носительниц риск-ассоциированных полиморфизмов этого гена.

Ключевые слова: ген рака молочной железы, полиморфизмы

В онкологической заболеваемости женщин в России рак молочной железы (РМЖ) занимает лидирующее место (20,9 %) [4]. На долю наследственного РМЖ приходится до 10 % наблюдений этого заболевания, из них около 30 % связано с мутациями в генах *BRCA1/2* (Breast CAncer genes) [7].

На сегодняшний день картирован и клонирован целый ряд генов, вовлеченных в канцерогенез при РМЖ и выполняющих функцию генов-супрессоров. В 90-х годах XX века был идентифицирован ген *BRCA1*, связанный с ранним раком молочной железы и яичника [12]. Продукт его экспрессии играет существенную роль в поддержании геномной стабильности и действует как классический опухолевый супрессор. В настоящее время описано свыше 2000 мутаций и полиморфизмов *BRCA1*, представляющих собой нонсенс- и миссенс-мутации, мутации сдвига рамки считывания, инсерции и делеции и мутации в сайтах сплайсинга. К основным риск-ассоциированным мутациям относятся те, которые приводят к преждевременному образованию стоп-кодонов и синтезу усеченного белкового продукта. Герминальные мутации *BRCA1* описаны в 45 % случаев наследственного РМЖ и в 2–30 % случаев при спорадической форме заболевания.

Предрасположенность к раку обеспечивается определенным спектром мутаций, который может быть уникальным для популяций разных географических районов и этнических групп. Молекулярная диагностика наследственных и спорадических форм рака, для которых известна роль конкретных генов, позволяет выбрать оптимальную стратегию лечения этих заболеваний. Наличие мутаций *BRCA1* влияет на морфологическую структуру опухоли, особенности течения заболевания и характер метастазирования – определяющий фактор для прогноза и оценки выживаемости при РМЖ [13].

Возможность ранней диагностики РМЖ актуальна для Приморского края, где около трети первичных больных выявляется на поздних стадиях онкологического процесса. Так, только за 2016 г. в регионе было зарегистрировано 868 новых случаев РМЖ, из которых у 32,8 % находились на III–IV стадии. Цель данной работы заключалась в анализе распространенности полиморфизмов гена *BRCA1* среди пациентов с онкологическими заболеваниями в Приморском крае.

Материал и методы

Обследовано 107 женщин с РМЖ в возрасте от 23 до 79 лет (средний возраст – 48 лет), лечившихся в Приморском краевом онкологическом диспансере и Дальневосточном окружном медицинском центре Федерального медико-биологического агентства России в 2012–2016 гг. Критериями формирования выборки стали: наличие злокачественных образований у родственников первой линии, молодой возраст (до 44 лет) при РМЖ без отягощенного наследственного анамнеза. У половины пациенток в семейном анамнезе регистрировались раки женской репродуктивной системы, желудка и простаты. Среди всех наблюдений восемь пришлось на РМЖ с билатеральным поражением, и три – на РМЖ на фоне беременности. Анализ проводился как у впервые выявленных больных, так и у ранее получавших лечение по поводу злокачественных новообразований. Наблюдения были условно разделены на две группы: 1-я группа – наследственный рак: 77 женщин с отягощенным семейным анамнезом по злокачественным новообразованиям молочной железы и яичников; 2-я группа – спорадический рак: 22 женщины с неотягощенным и 8 женщин с неизвестным наследственным онкологическим анамнезом. Кроме того, были выделены две возрастные категории: до 44 лет (48 человек) и 45 лет и более (59 человек).

Таблица
Анализируемые участки гена *BRCA1*

Экзон	Участок белка	Мутация	Длина фрагмента, п.н.	Покрывание экзона, %
3	RING-домен	185delAG*	584	100
5		300T>G(C61G)	420	100
11	Центральный сегмент белка	3819delGTAAA* 3875delGTCT*	490	30
		4153delA*		
		2680del5	310	
		Q356R	490	
20	BRCT-домен	5382insC*	369	100
21		M1775R	344	100
24		5677insA	325	100

* Мутации, распространенные на территории России.

Генетический материал получали из лейкоцитов периферической крови с помощью коммерческого набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, США). Целевые фрагменты геномной ДНК выделялись в полимеразной цепной реакции. Для изучения спектра мутаций и поиска прогностически значимых молекулярных маркеров были выбраны шесть участков гена *BRCA1*, на которые приходится большинство сообщений о риск-ассоциированных вариантах (табл.). Прямое секвенирование было выполнено с использованием тех же самых праймеров в обоих направлениях на автоматическом ДНК анализаторе 3130xL (Applied Biosystems, США). Качество хроматограмм контролировали программой Sequence Scanner 1.0. Последовательности участков генов анализировали с помощью программы MEGA 6. Идентификацию мутаций выполняли с помощью сервера NCBI.

Результаты исследования

Анализ гена *BRCA1* был проведен методом прямого секвенирования некоторых экзонов – 3, 5, 11 (частично), 20, 21 и 24 – и прилегающих к ним областей интронов. В результате установлено, что 24 пациентки – 22,4% наблюдений – были носителями пяти полиморфных вариантов гена (одновременного носительства нескольких полиморфизмов не обнаружено). У 11 человек была определена инсерция 5382insC (rs80357906), 10 женщин оказались носителями миссенс-варианта Q356R (rs1799950), в единичных случаях обнаружены миссенс-вариант С61G (Т300G, rs28897672), делеция 3819del5 с преждевременным стоп-кодоном (rs80357609) и делеция 4154delA со сдвигом рамки (rs80357711). При исследовании спектра мутаций среди носительниц полиморфных вариантов 46% наблюдений пришлось на 5382insC, 42% – на Q356R и по 4% – на С61G, 3819del5 и 4154delA.

Среди женщин в возрасте до 44 лет мутации *BRCA1* были обнаружены у 15 из 48 человек:

5382insC – 8 случаев Q356R – 5 случаев. Остальные мутации – С61G, 3819del5 и 4154delA – в этой возрастной категории встретились по одному разу. У женщин после 45 лет мутации *BRCA1* были выявлены у 8 из 59 человек: 5382insC – 3 случая, Q356R – 5 случаев. Примечательно, что у более молодых женщин обнаружены пять полиморфизмов, тогда как в категории лиц от 45 лет и старше – только два. Таким образом, шанс обнаружения мутации *BRCA1* у женщин с РМЖ в возрасте до 44 лет был гораздо выше – 31,2 против 13,6%, соответственно.

Среди женщин с наследственным РМЖ выявлено 16 человек с носительством мутаций *BRCA1* (14,9%), тогда как в группе спорадического РМЖ мутации были идентифицированы только в 8 случаях (7,4%). Примечательно, что все три мутации – С61G, 3819del5, 4154delA были выявлены у пациенток с отягощенным семейным анамнезом по раку молочной железы и яичников. Мутация 5382insC чаще обнаруживалась у женщин с отягощенным онкологическим анамнезом, причем не только по части злокачественных новообразований молочной железы и репродуктивной системы, но и опухолей других локализаций (легкие, желудок, простата). Миссенс-мутация Q356R была установлена у семи больных РМЖ, которые не имели семейного онкологического анамнеза (или он был неизвестен).

Обсуждение полученных данных

Прямое секвенирование ДНК по Сэнгеру продолжает оставаться золотым стандартом для выявления мутаций при молекулярном анализе генов *BRCA* [14]. Ген *BRCA1* (OMIM 113705) локализуется на длинном плече 17-й хромосомы, его длина составляет около 80 тыс. п.н. [12]. мРНК *BRCA1* включает 24 экзона, покрывая белок-кодирующий участок в 5,5 тыс. п.н., длина самого большого 11-го экзона составляет 3,4 тыс. п.н. При разработке олигонуклеотидных праймеров к участкам гена *BRCA1* мы руководствовались их функциональной значимостью, а также встречаемостью патогенных мутаций *BRCA1* на территории России (табл.).

Большинство мутаций в гене *BRCA1* на нашем материале приходилось на 20-й экзон (5382insC, rs80357906). Данная мутация определяет сдвиг рамки считывания и преждевременное образование стоп-кодона. В результате в *BRCA1* отсутствует часть BRCT-повторов, что сопровождается частичной потерей функции белка в процессах репарации и регуляции клеточного цикла. Другой распространенный среди больных Приморского края полиморфный вариант *BRCA1* локализовался в 11-м экзоне гена. Он представляет собой миссенс-вариант Q356R (rs1799950) в результате замены Т1294С. Данный полиморфизм приходится на серин-обогащенный домен, ассоциированный с BRCT. Появление дополнительного положительного заряда от аргинина может привести к изменению пространственной структуры белка, а также повлиять на его взаимодействие с другими

протеинами. Еще одна обнаруженная миссенс-мутация С61G (Т300G, rs28897672), находящаяся в 5-м экзоне, обуславливает нарушение убиквитин-лигазной активности белка, вследствие чего повышается радиочувствительность опухоли [11]. Две обнаруженные делеции 3819delGТAAA (rs80357609) и 4154delA (rs80357711) находятся в 11-м экзоне и способствуют сдвигу рамки считывания и образованию усеченного белка, в котором также отсутствуют BRCT-повторы.

С эпидемиологической точки зрения большой интерес представляет мутация 5382insC – самый распространенный полиморфизм на территории России. По данным Л.Н. Любченко [7], ее частота среди пациентов с наследственным РМЖ в Москве составляет 20,2%, а в неселективной выборке – только 3,9%. Среди 2833 женщин с РМЖ в Санкт-Петербурге у 121 (4,3%) были выявлены мутации в гене *BRCA1*, где на долю 5382insC пришлось 70,4% наблюдений [2]. Также эта мутация занимает лидирующее место в спектре повреждений *BRCA1* в Южном и Сибирском федеральных округах, но только среди славян [3, 6]. У коренного населения Сибири данной мутации не обнаружено [10]. В республике Адыгея мутация 5382insC была выявлена только у одной пациентки славянского происхождения с РМЖ, а среди адыгов она найдена не была [1]. В российской популяции больных РМЖ частота мутации 5382insC *BRCA1* может достигать до 80% и выше – это наиболее высокая частота из найденных ранее в других популяциях [5].

Также показана связь между носительством мутации Q356R *BRCA1* и развитием первично-множественных злокачественных опухолей [9]. В некоторых работах сообщалось о защитной роли этого полиморфизма и его обратной связи с риском развития РМЖ, однако в исследованиях других специалистов показано, что данным полиморфизм ассоциирован с семейным раком яичника [15].

На долю мутации С61G *BRCA1* среди больных наследственным РМЖ в Москве приходится 1,9%, а в Южном Федеральном округе – 2,2% случаев. Среди же больных со sporadическим РМЖ в Сибирском регионе частота этой мутации составляет 0,35% [3, 6, 7]. Относительно редкой можно назвать мутацию 3819del5, которая обнаружена среди лиц с отягощенным семейным анамнезом по РМЖ в Москве с частотой 0,6%, а в Санкт-Петербурге – 2,3%. В то же время в Южном Федеральном округе и Республике Адыгея случаи носительства этой мутации не описаны [1–3, 7, 8]. К редким мутациям *BRCA1* относится также 4154delA. Сообщается, что ее доля в Москве среди пациенток с наследственным РМЖ составляет 0,3%, а в Сибирском регионе среди пациентов со sporadическим РМЖ – 0,18% [6, 7].

Исследование мутаций гена *BRCA1* в российских популяциях началось относительно недавно, однако, даже немногочисленные работы демонстрируют, что преобладающей, как и во многих европейских странах, здесь можно назвать мутацию 5382insC. Таким

образом, спектр полиморфизмов в гене *BRCA1* в приморской популяции представлен пятью вариантами с преобладанием инсерции 5382insC и миссенс-мутации Q356R, частоты встречаемости которых составили – 46 и 42%, соответственно.

Заключение

Полученные данные уникальны и перспективны для Приморского края, так как исследования региона-специфического спектра полиморфизмов гена *BRCA1* у онкологических больных ранее не проводились. Результаты анализа показывают, что в спектре мутаций высокого риска среди женщин, страдающих РМЖ, в Приморском крае преобладают 5382insC (мутация сдвига рамки считывания) и Q356R (миссенс-вариант). Учитывая данные о распространении полиморфизма Q356R преимущественно у больных РМЖ с неотягощенным семейным анамнезом, можно предположить, что данный миссенс-вариант скорее ассоциирован со sporadической формой заболевания, в то время как 5382insC – с наследственной.

Информация о региональном спектре мутаций *BRCA1* позволит разработать методы для быстрого тестирования, диагностирования и формирования групп риска, а также профилактики РМЖ среди здоровых женщин – носительниц риск-ассоциированных полиморфизмов этого гена.

Работа частично выполнена при поддержке Дальневосточного федерального университета, проект № 14-08-06-15_и.

Литература / References

1. Анохина Е.Н. Полиморфизмы генов про- и противовоспалительных цитокинов, мутации генов *BRCA1/2* при злокачественных новообразованиях органов женской репродуктивной системы: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Маикоп, 2015. 25 с.
Anokhina E.N. Polymorphisms of genes pro-and anti-inflammatory cytokines, mutations *BRCA1/2* in malignant neoplasms of the female reproductive system: Abstract of MD thesis. Maikop, 2015. 25 p.
2. Бит-Сава Е.М. Молекулярно-биологическое обоснование лечения *BRCA1/CHEK2/BLM* ассоциированного и sporadического рака молочной железы: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб., 2014. 48 с.
Beat-Sava E.M. Molecular-biological substantiation of treatment of *BRCA1/CHEK2/BLM* associated and sporadic breast cancer: Abstract of PhD thesis. Saint Petersburg, 2014. 48 p.
3. Богомолова О.А., Шатова Ю.С., Верескунова М.И. [и др.]. Герминальные мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* у пациенток Юга России с клиническими признаками наследственного рака молочной железы // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 5. URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26920> (дата обращения: 02.11.2017).
Bogomolova O.A., Shatova U.S., Vereskunova M.I. et al. Germline mutation in *BRCA1* and *BRCA2* in patients in southern Russia with clinical signs of hereditary breast cancer// Modern problems of science and education. 2017. No. 5. URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26920> (date of access: 02.11.2017).
4. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2015 году // Вестник Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН. 2016. Т. 27, № 3 (прил. 1). 172 с.
Davidov M.I., Aksel E.M. Malignant neoplasms in Russia and CIS

- in 2015 years // Bulletin of the Russian Blokhin Cancer Research Center RAMS. 2016. T. 27, No. 3 (Suppl. 1). 172 p.
5. Карпукхин А.В., Поспехова Н.И., Любченко Л.Н. [и др.]. Частоты однонуклеотидных полиморфизмов и мутаций в гене *BRCA1* при наследственно обусловленном раке молочной железы и яичников // Доклады Академии наук. 2002. Т. 383, № 5. С. 706–709.
Karpukhin A.V., Pospekhova N.I., Lubchenko L.N. [et al.]. Frequency of single nucleotide polymorphisms and mutations in the *BRCA1* in hereditary breast and ovarian cancer // Proceedings of the Russian Academy of Sciences. 2002. Vol. 383, No. 5. P. 706–709.
 6. Коваленко С.П. Наследственные и соматические мутации как молекулярные маркеры для диагностики и лечения рака молочной железы: автореф. дис. ... д-ра. биол. наук. Новосибирск, 2014. 35 с.
Kovalenko S.P. Hereditary and somatic mutations as molecular markers for diagnosis and treatment of breast cancer: Abstract of PhD thesis. Novosibirsk, 2014. 35 p.
 7. Любченко Л.Н. Генетическое тестирование при наследственном раке молочной железы // Практическая онкология. 2014. Т. 15, № 3. С. 107–117.
Lubchenko L.N. Genetic testing for hereditary breast cancer // Practical oncology. 2014. Vol. 15, No. 3. P. 107–117.
 8. Поспехова Н.И. Комплексный анализ наследственной формы рака молочной железы и/или яичников: молекулярно-генетические и фенотипические характеристики: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2011. 47 с.
Pospekhova N.I. Complex analysis of hereditary breast and ovarian cancer: molecular-genetic and phenotypic characteristics of breast cancer author's: Abstract of PhD thesis. Moscow, 2011. 47 p.
 9. Сытенкова К.В. Клинические особенности различных генотипических вариантов при наследственном и sporadicком раке молочной железы: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2013. 27 с.
Sitnikova K.V. Clinical features of different genotype in hereditary and sporadic breast cancer: author's: Abstract of MD thesis. Moscow, 2013. 27 p.
 10. Чердынцева Н.В., Писарева Л.Ф., Панферова Е.В. [и др.]. Этнические аспекты наследственного рака молочной железы в регионе Сибири // Вестник РАМН. 2014. № 11–12. С. 72–79.
Cherdintseva N.V., Pisareva L.F., Panferova E.V. [et al.]. Ethnic aspects of hereditary breast cancer in the region of Siberia // Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences. 2014. No. 11–12. P. 72–79.
 11. Drost R., Bouwman P., Rottenberg S. [et al.]. *BRCA1* RING function is essential for tumor suppression but dispensable for therapy resistance // Cancer Cell. 2011. Vol. 20. P. 797–809.
 12. Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D. [et al.]. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1* // Science. 1994. Vol. 266. P. 66–71.
 13. Musolino A., Bella M.A., Bortesi B. [et al.]. *BRCA* mutations, molecular markers, and clinical variables in early-onset breast cancer: a population-based study // Breast. 2007. Vol. 16. P. 280–292.
 14. Vuttariello E., Borra M., Calise C. [et al.]. A new rapid methodological strategy to assess *BRCA* mutational status // Mol. Biotechnol. 2013. Vol. 53. P. 954–960.
 15. Wenham R.M., Schildkraut J.M., McLean K. [et al.]. Polymorphisms in *BRCA1* and *BRCA2* and risk of epithelial ovarian cancer // Clinical Cancer Research. 2003. Vol. 9. P. 4396–4403.
- Поступила в редакцию 02.02.2018.

BRCA1 RING function is essential for tumor suppression but dispensable for therapy resistance

I.S. Gulyan¹, N.Yu. Chernysheva^{2,3}, A.M. Stenkova^{2,3}, V.I. Nevozhay¹, M.P. Isaeva^{2,3}

¹ Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690002 Russian Federation), ² Far Eastern Federal University (8 Sukhanova St. Vladivostok 690090 Russian Federation), ³ G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry (159 100-let Vladivostoku Ave. Vladivostok 690022 Russian Federation)

Objective. The problem of reducing mobility and mortality from breast cancer (BC) is continuing to be an acute issue of women's health. The possibility of early diagnosis is particularly relevant for citizens of the Primorsky Krai where about a third of primary patients are identified in late stage. However, there is no information on the regional spectra of BC risk-associated mutations.

Methods. We examined 107 women with breast cancer, aged between 23 and 79 years, without and with a family history. The search for the mutations was performed on six regions of the *BRCA1* gene by polymerase chain reaction and sequencing.

Results. We identified five risk-associated polymorphisms: insertion of 5382insC (rs80357906), missenses of Q356R (rs1799950) and C61G (T300G, rs28897672), deletions 3819del5 (rs80357609) and 4154delA (rs80357711).

Conclusions. The results of the study show that two mutations predominate in the spectrum of high-risk *BRCA1* mutations among breast cancer patients such as 5382insC (46%) and Q356R (42%).

Keywords: breast cancer genes, polymorphisms

Pacific Medical Journal, 2018, No. 1, p. 44–47.

УДК 618.19–006.4–07(571.620)

DOI: 10.17238/Pmj1609-1175.2018.1.47–51

Региональные тенденции распространения рака молочной железы

А.С. О¹, Н.Э. Косых², Т.А. Белова¹, В.И. Апанасевич³

¹ Краевой клинический центр онкологии (680047, г. Хабаровск, Воронежское шоссе, 164),

² Дальневосточный государственный медицинский университет (680000, г. Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского, 35),

³ Тихоокеанский государственный медицинский университет (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Анализ многолетней статистики распространения рака молочной железы среди жителей Хабаровского края показал, что уровень региональной заболеваемости соответствует среднероссийским показателям. За 2003–2015 гг. абсолютное число заболевших здесь увеличилось на 22,9%, этот диагноз был поставлен 6548 пациенткам, причем уровень выявления рака молочной железы при плановых профилактических осмотрах увеличился с 13,4% в 2003 г. до 36,9% в 2015 г. Около 1/3 больных выявлено на III–IV стадии заболевания. Недостаточный уровень ранней диагностики обусловлен низкой медицинской грамотностью населения и отсутствием онкологической настороженности персонала организаций первичной медико-санитарной помощи, а также отсутствием программы маммографического скрининга рака молочной железы для женщин старше 40 лет.

Ключевые слова: рак молочной железы, заболеваемость, диагностика, Хабаровский край