

УДК618.19-006.6:575(477.85)

Т.В. Крук,

О.П. Пересунько,

Р.А. Волков*

Вищий державний навчальний заклад України "Буковинський державний медичний університет", м. Чернівці
Чернівецький національний університет ім. Ю.Федьковича*

Ключові слова: мутації гена BRCA1, хворі на рак молочної залози та їх родичі.

МОЛЕКУЛЯРНО - ГЕНЕТИЧНЕ ВИВЧЕННЯ ТИПІВ МУТАЦІЙ ГЕНА BRCA1 У ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ТА ЇХ РОДИЧІВ У ЧЕРНІВЕЦЬКІЙ ОБЛАСТІ УКРАЇНИ

Резюме. Вивчена частота виявлення мутації 185delAg та 5382insC у гені BRCA1 у хворих на рак молочної залози та їх родичів у Чернівецькій області України, що підтверджує необхідність спеціального медико-генетичного обстеження сімей із наявністю в родовах хворих на рак молочної залози.

Вступ

У 1990-1995 роках виявлені мутації різних генів, що мають пряме відношення до виникнення раку яєчників і молочної залози. Це ген-супресор BRCA, що локалізується на довгому плечі хромосоми 17, і ген-супресор BRCA2, що локалізується на довгому плечі хромосоми 13, у нормі контролюючі клітинне зростання тканини яєчників і молочної залози [8]. Сьогодні в усіх ведучих молекулярно-генетичних лабораторіях світу проводяться інтенсивні дослідження, спрямовані на вивчення ролі цих мутацій в етіології і патогенезі спадкових форм раку жіночої репродуктивної системи. Попередні дані показують, що для носіїв патогенетичного гена BRCA1 ризик розвитку раку молочної залози (PMЗ) становить 44-80%, а раку яєчників 15-60% [1]. Кумулятивний ризик розвитку первинного раку обох локалізацій становить 90-100% [9].

Є дані, що 50% носіїв патологічного гена BRCA1 хворіють на рак молочної залози у віці до 50 років, а жінки, в особистому анамнезі яких був рак молочної залози, схильні до надзвичайно високого ризику (65%) розвитку первинного раку контрлатеральної молочної залози [10,7]. Ризик розвитку раку яєчників для таких жінок становить близько 44% [10,11]. Встановлено, що мутації гена BRCA1 також трапляються при серозній карциномі очеревини, причому з такою ж частотою, що і при раку яєчників. Автори вважають, що карцинома очеревини може бути одним із клінічних проявів синдрому сімейного раку молочної залози/яєчників [14,12].

Показано, що носійство патологічного гена BRCA2 в основному асоціюється з ризиком розвитку PMЗ, причому як для жінок, так і для чоловіків. Для жінок цей ризик складає 55-85%, а для чоловіків - близько 6% [6,4]. Крім того відзна-

чено, що серед чоловіків - носіїв мутації гена BRCA2 спостерігається підвищена частота раку передміхурової і підшлункової залоз [13]. Ризик розвитку раку яєчників для носіїв патологічного гена BRCA1 становить 15-27% [12,14].

Встановлено, що в носіїв гена BRCA1 рак яєчників дебютує на 10 років раніше, ніж у носіїв гена BRCA2 (середній вік жінок складає 50,2 і 59,9 року відповідно) [8].

Багатьма авторами показано, що серед євреїв Ашкеназі, вихідців із Центральної, Східної Європи і Північної Америки, спостерігається підвищена частота (1:45 жінок) двох типів мутацій гена BRCA185 delAG і 5382 ins C) і тільки один варіант мутації гена BRCA2 (6174 del T) [5]. У загальній єврейській популяції ці мутації трапляються з частотою 0,8, 0,4 і 1,2% відповідно [11]. Встановлено, що близько 20-30% представниць єврейської популяції, хворих PMЗ у віці до 40 років, і 40-60% жінки, які захворіли на рак яєчників, є носіями однієї з вищезгаданих мутацій, незалежно від їх сімейного анамнезу [9,3].

Серед жінок інших національностей популяційна частота носіїв мутацій гена BRCA1 і BRCA2 складає 1:500 і 1:833 жінок відповідно [1,14]. В Україні масштабні дослідження мутацій у генах BRCA1 та BRCA2 проведені у хворих на рак молочної залози в Донецькому обласному протипухлинному центрі [1]. Дані результати отримані в екологічно несприятливому регіоні України. Тому було б цікавим вивчення аналогічних мутацій у хворих на рак молочної залози та їх родичів в екологічно стабільному регіоні Західної України, де вплив зовнішнього канцерогенного чинника практично нейтральний.

Мета дослідження

Вивчення мутацій гена BRCA1 - 185del Ag та

5382ins C у хворих на РМЗ та їх родичів для визначення нових напрямів профілактики, діагностики та лікування РМЗ.

Матеріал і методи

Генотипування мутацій 185delAg та 5382insC у гені BRCA1 проведені у крові 74 хворих на РМЗ, 42 родичів 1-го ступеня спорідненості, 24 пацієнтки - практично здорові (контрольна група).

Загальну геномну ДНК виділяли з крові згідно зі стандартним протоколом з використанням протеїнази К та додецилсульфату натрію в якості детергенту.

Для генотипування по гену BRCA1 проводили ампліфікацію відповідного фрагмента ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням розроблених нами пар праймерів RV1001 (5'-GACGTTGTCATTAGTCTTTGGTTTG-3') + RV1002 (5'-TGCTGACTTACCAGATGGAGACT-3') для мутації 185delAG та RV1003 (5'CCTGAATGCCTTAAATATGACGTG3')+RV1004(5'GAGCTTTACSTTTCCGTCCTGGG-3') для мутації 5382insC. Кількість ДНК для проведення ПЛР становила 50 нг на реакцію. Ампліфікацію ДНК проводили в середовищі такого складу: 1 x буфер для ПЛР (PCR-buffer, Qiagen, США), MgCl₂ - 2 mM, суміш dNTP - 0.4 mM кожного, праймери - 1 mM кожного, ДНК-полімераза (HotStartTaq, Qiagen) - 3 од. активності на реакцію. Загальний об'єм реакційної суміші складав 50 мкл. ПЛР проводили з використанням ампліфікатора PTC-100 (MJ Research Inc, США) за такою програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази - 95°C, 2 хв; (2) денатурація ДНК - 94°C, 45 с; (3) гібридизація праймерів - 54°C, 40 с; (4) синтез ДНК - 72°C, 1 хв; (5) закінчення ампліфікації - 72°C, 8 хв; (6) припинення реакції - 4°C. Загальна кількість циклів ампліфікації - 35. Аналіз результатів ПЛР проводили методом електрофорезу у 2% агарозному гелі (Маниатис и др., 1984). Для візуалізації ДНК гель забарвлювали етидієм бромідом та фотографували в ультрафіолетовому світлі на установці GelDoc 2000 (BioRad, США). Для визначення довжини отриманих фрагментів їх електрофоретичну рухливість порівнювали з рухливістю ДНК-маркера Gene Ruler DNA Leader Mix (Fermentas, Литва).

Для виявлення поліморфізму у гені BRCA1 отримані продукти ПЛР обробляли сумішшю рестриктаз Hinf I + Dra I у випадку мутації 185delAG та Bse LI + Hind III у випадку мутації 5382insC. Реакцію проводили згідно з рекомендаціями виробника ферментів (Fermentas, Литва). Отримані рестриктні фрагменти аналізували методом електрофорезу в 10% поліакриламідному

гелі (Маниатис и др., 1984).

Очікувані довжини фрагментів ДНК та розташування сайтів пізнавання застосованих рестриктаз проводили за допомогою пакета програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR із використанням послідовності гена BRCA1, яка наявна у базі даних Genbank.

Обговорення результатів дослідження

Досліджено розповсюдженість серед населення Чернівецької області двох мутацій у гені BRCA1: 185del Ag та 5382ins C. Ці дві мутації обрано для дослідження тому, що згідно із даними літератури вони підвищують ризик виникнення раку та належать до найбільш поширених серед населення Східної Європи.

Ідентифікації мутацій у гені BRCA1 проводили методом ПЛР-ампліфікації бажаної ділянки гена з використанням специфічних праймерів із подальшою обробкою отриманих ПЛР-продуктів рестриктазами для виявлення поліморфізму послідовності ДНК. Ідея методу ґрунтується на тому, що порушення нуклеотидної послідовності гена внаслідок мутації призводить до появи або зникнення сайту впізнавання певної рестриктази. Останнє може бути виявлено як зміна в наборі рестриктних фрагментів. Відповідно, на першому етапі дослідження з використанням інформації, наявної в базі даних Genbank розраховано розташування в гені BRCA1 сайтів впізнавання рестриктаз, застосованих в експериментах (рис. 1) та очікувані розміри фрагментів рестрикції (табл.).

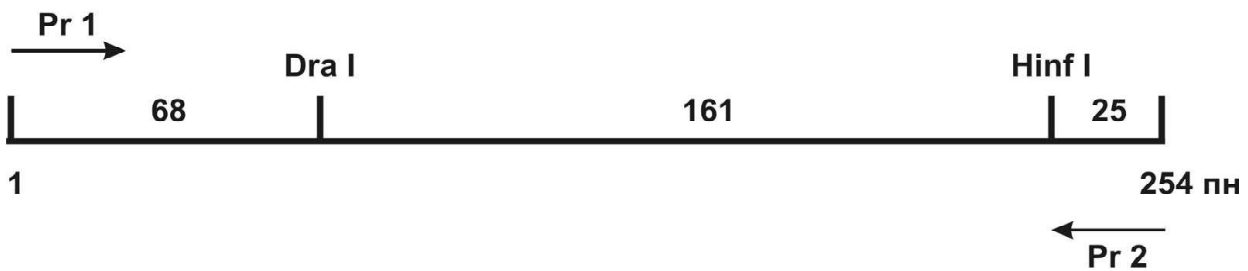
У результаті ПЛР-ампліфікації для всіх досліджених зразків ДНК одержано ПЛР-продукти, розміри яких відповідали очікуваним, а саме - 254 нп для мутації 185delAG та 187 нп - для 5382insC (рис. 2). На наступному етапі експериментів отримані ПЛР-продукти обробляли сумішшю двох рестриктаз кожний. При цьому одна із рестриктаз застосовувалася для ідентифікації поліморфізму в послідовності ДНК (185delAG - рестриктаза Hinf I, 5382insC - рестриктаза Bse I). Уведення до складу реакційної суміші другої рестриктази (відповідно Hind III або Dra I) призводило до появи додаткового рестриктного фрагмента постійної довжини, який являв собою внутрішній контроль для кожного досліджуваного зразка. Результати електрофоретичного розділення продуктів рестрикції, отриманих для 10 пробандів наведено на рис.2. Аналогічні результати отримано і для решти досліджених зразків ДНК. Порівняння наборів отриманих фрагментів свідчить, що серед 40 досліджених пробандів виявлено одну людину - носія мутації 5382ins C у гомозиготному стані (рис. 2Б, пробанд №8).

Таблиця

Очікувані розміри фрагментів ДНК, які отримуються при ідентифікації мутацій у гені BRCA1

| Мутація у гені BRCA1 | Праймери, застосовані для ПЛР | Розмір продукту ПЛР | Рестриктази, використані для обробки | Розмір рестриктних фрагментів | |
|----------------------|-------------------------------|---------------------|--------------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| | | | | алель дикого типу | мутантний алель |
| 185delAG | Pr1 (RV1001) + Pr2 (RV1002) | 254 нп | Hinf I + Dra I | 161, 68, 25 | 186, 68 |
| 5382insC | Pr3 (RV1003) + Pr4 (RV1004) | 187 нп | Bse I + Hind III | 138, 49 | 118, 49, 20 |

185delAG



5382insC

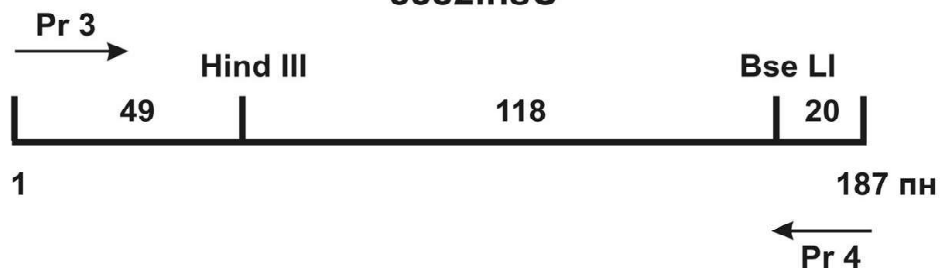


Рис 1. Розташування сайтів впізнавання рестриктаз Dra I, Hinf I, Hind III та Bse I у ПЛР-продуктах, отриманих із використанням праймерів Pr1+Pr2 та Pr3+Pr4

А

Б

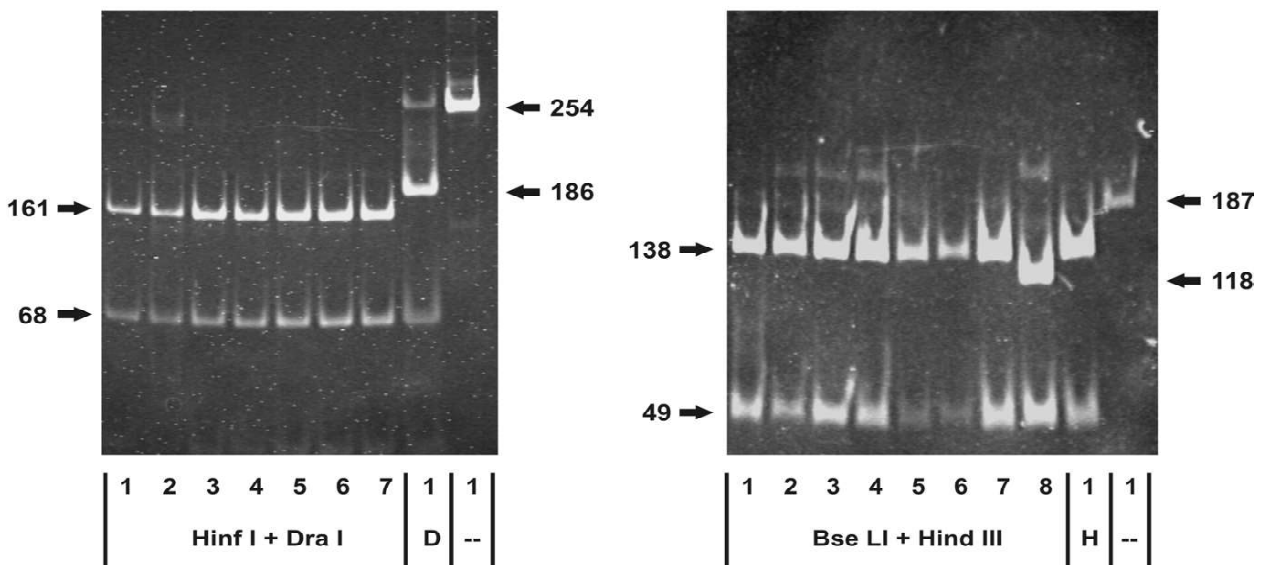


Рис 2. Генотипування мутацій 185delAG (А) та 5382insC (Б) у гені BRCA1. Результати електрофоретичного розділення рестриктних фрагментів, які утворилися за дії рестриктаз Hinf I, Dra I (D), Bse I та Hind III (H) на ПЛР-продукти. Цифрами під малюнком позначено номери зразків ДНК

Носіїв мутації 185del Ag не виявлено. Згідно з проведеними дослідженнями та даними літератури, скринінгу повинні підлягати кожні 6-12 місяців усі пацієнтки, щодо групи моногенно-детермінованого ризику, починаючи з віку 25 років або на 10 років раніше того віку, в якому розвинулася пухлина в наймолодшого родича першого ступеня спорідненості [11, 2]. Проте жоден з нині існуючих скринінгових тестів і їх комбінацій, на жаль, не забезпечують точної діагностики пухлин на доклінічних етапах розвитку. Система ж профілактики раку молочної залози відносно носіїв патологічних генів, повинна включати [13]:

- Первинну профілактику у вигляді реалізованої репродуктивної функції і дієти з пониженим вмістом жирів тваринного походження.

- Скринінг, що включає клінічне обстеження молочних залоз, визначення рівня пухлинних маркерів, мамографію та ін.

- Корекцію гормонального профілю.

Проте, незважаючи на розробку нових методів і технологій скринінгу і лікування раку, проблема ранньої діагностики і профілактики спадкових пухлин сьогодні впирається у відсутність організаційної системи, здатної виявити і зареєструвати контингент осіб із спадковим онкоризиком і забезпечити цих осіб адекватною діагностичною і лікувально-оздоровчою допомогою. Альтернативним підходом до вирішення цієї проблеми є створення в загальній системі охорони здоров'я спеціалізованої служби з надання комплексної онкогенетичної допомоги жіночому населенню. З організаційної точки зору така служба повинна здійснювати:

- спеціалізовану медико-генетичну консультацію та на її основі створення онтогенетично реєстру і відбір контингенту осіб зі спадково-зумовленим ризиком розвитку раку органів жіночої репродуктивної системи;

- клінічний моніторинг за станом здоров'я цих осіб із використанням усього арсеналу доступних заходів первинної і вторинної профілактики раку.

Висновки

Попередні спостереження за хворими на рак молочної залози та їх родичами, в яких проводилося генотипування мутацій гена BRCA1, показують перспективність подальших досліджень у галузі онкогенетики та молекулярної біології для розвитку сучасних вискоефективних технологій зі зміною пріоритетів на профілактичну направленість і відбір жінок у групу генетичного ризику з метою виявлення раку на доклінічній стадії.

Перспективи подальших досліджень

Вивчення мутацій 5382ins C у гені BRCA1 переконливі для молекулярно-генетичного моніторингу групи ризику захворювання на рак молочної залози.

Література. 1. BRCA1 и BRCA2 у больных раком молочной железы Донецкой области / Г.В. Боднар, И.Е. Седяков, О.В. Кайряк [и др.] // Медико-социальные проблемы сѣм'ї. - 2009. - Т. 14, № 4. - С. 53 - 58. 2. Запорожан В.Н. Генетическая генетика / В.Н. Запорожан. - Одесса, 2008. - С. 222-287. 3. Генодиагностика наследственной предрасположенности к раку молочной железы и разработка индивидуального прогнозирования / Л.Н. Любченко, Р.Ф. Гарькавцева, Н.И. Потехина [и др.] // Онкология. - 2002. - suppl. - С. 26-27. 4. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование при наследственной предрасположенности к раку молочной железы / Л.Н. Любченко, Р.Ф. Гарькавцева, Н.И. Поспехова [и др.] // Возможности современной онкологии в диагностике и лечении злокачественных заболеваний. - М. - 2003. - С. 44 - 47. 5. Зборовская И.Б. Молекулярно-биологические исследования онкогенов и генов-супрессоров в практике клинической онкологии / И.Б. Зборовская // Канцерогенез. - М.: Медицина, 2004. - С. 361 - 379. 6. Зорин В. Прогностическое значение семейного анамнеза для выживаемости онкологических больных / В. Зорин, Р. Кербер // Вопр. онкол. - 2001. - Т. 47, № 4. - С. 396 - 400. 7. Любченко Л.Н. Генодиагностика наследственной предрасположенности к раку молочной железы и разработка системы индивидуального прогнозирования развития, течения и профилактики заболевания: автореф. дис. канд. мед. наук. - 2002. - 42 с. 8. Мендельштам М. Ю. Изучение предрасположенности к развитию злокачественных онкологических заболеваний, обусловленной наследуемыми мутациями в генах BRCA1 и BRCA2 / М. Ю. Мендельштам // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике: Сб. науч. трудов. - Новосибирск. - 2003. - № 3. - С. 92 - 109. 9. Мушкваров Н.Н. Молекулярная биология / Н.Н. Мушкваров, С.Л. Кузнецов - М.: Мед. информ. Агентство, 2003. - С. 535. 10. Пальцев М.А. Введение в молекулярную медицину / Пальцев М.А. - М.: ОАО "Изд. Медицина", 2004. - С. 496. 11. Appropriateness of breast-conserving treatment of breast carcinoma in women with germline mutations in BRCA1 or BRCA2: A clinicbased series / M. Robson, T. Svahn, B. McCormick [et al.] // Cancer. - 2005. - № 103. - P. 44 - 51. 12. Selection bias influences reported contralateral breast cancer incidence and survival in high risk non-BRCA1/2 patients / M.M. Tilanus Linthorst, K.C. Bartels, C. Alves [et al.] // Breast Cancer Res Treat. - 2006. - № 95. - P. 117 - 123. 13. Survival and prognostic factors in BRCA1-associated breast cancer / С.Т. Brekelmans, С. Seynaeve, М. Menke-Pluymers [et al.] // Ann Oncol. - 2006. - № 17. - P. 391 - 400. 14. The presence of the hereditary BRCA1 gene mutations in women with familial breast or ovarian cancer and the frequency of occurrence of these tumors in their relatives / E. Skasko, Z. Paszko, A. Niwinska [et al.] // Eur. J. Gynec. Oncol. - 2004. - Vol. 25, N 4. - P. 470 - 474. 15. Twenty three novel BRCA1 and BRCA2 sequence alterations in breast and/ or ovarian cancer families in Southern Germany / P. Meyer, T. Voigtlaender, C. R. Bartram, R. Klaes // Hum. Mut. - 2003. - Vol. 22, N 3. - P. 259.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТИПОВ МУТАЦИЙ ГЕНА BRCA1 У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ИХ РОДСТВЕННИКОВ ЧЕРНОВИЦКОЙ ОБЛАСТИ УКРАИНЫ

Т. В. Крук, А. П. Пересунько, Р. А. Волков

Резюме. Изучена частота выявления мутаций 185delAg и 5382insC в гене BRCA1 у больных раком молочной железы и их родственников в Черновицкой области Украины, которая подтверждает необходимость специального медико-генетического обследования семей с наличием в родословных больных раком молочной железы.

Ключевые слова: мутации гена BRCA1, больные раком молочной железы и их родственники.

**MOLECULAR GENETIC STUDY OF TYPES OF
MUTATIONS OF BRCA1 GENE IN PATIENTS WITH
BREAST CANCER AND THEIR RELATIVES IN
CHERNIVTSY REGION OF UKRAINE**

T. V. Kruk, O. P. Peresun'ko, R. A. Volkov

Abstract. The frequency of detecting mutations 185delAg и 5382insC in BRCA1 gene patient with breast cancer and their relatives in Cernivtsi region of Ukraine has been studied. It proves the necessity of special medicogenetic counseling of families with the presence of patients with breast cancer in pedigrees.

Key words: mutation of BRCA1 gene, patient with breast cancer, relatives.

**Higher State Educational Establishment of Ukraine
"Bukovinian State Medical University", Chernivtsi**

Yu. Fedkovic National University, Chernivtsi

Clin. and experim. pathol.- 2016.- Vol.15, №4 (58).-P.64-68.

Надійшла до редакції 5.12.2016

Рецензент – проф. О.В.Кравченко

© Т.В. Крук, О.П. Пересунько, Р.А. Волков, 2016