

Т. В. Крук, О.П. Пересунько, Р.А.Волков¹

Молекулярно – генетичне вивчення типів мутацій гену *BRCA1* у хворих на рак молочної залози та їх родичів Чернівецької області України

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці, Україна

Чернівецький Національний університет ім. Ю.Федьковича¹

Реферат. Вивчена частота виявлення мутацій 185delAg та 5382insC в гені *BRCA1* у хворих на рак молочної залози та їх родичів в Чернівецькій області України, що підтверджує необхідність спеціального медико-генетичного обстеження сімей з наявністю в родоводах хворих на рак молочної залози.

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

Вступ. У 1990-1995 роках були виявлені мутації різних генів, що мають пряме відношення до виникнення раку яєчників і молочної залози. Це ген-супресор *BRCA1* що локалізується на довгому плечі хромосоми 17, і ген-супресор - *BRCA2*, що локалізується на довгому плечі хромосоми 13, в нормі контролюючі клітинний поділ тканини яєчників і молочної залози [1]. 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 складає 44-80%, а раку яєчників - 15-60% [2]. Кумулятивний ризик розвитку первинного раку обох локалізацій складає 90-100% [3].

Є дані, що 50% носіїв патологічного гена *BRCA1* хворіють раком 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 [4]. Ризик розвитку раку яєчників для таких жінок становить близько 44% [5]. Встановлено, що мутації гена *BRCA1* також зустрічаються при серозній карциномі очеревини, причому з такою ж частотою, що і при раку яєчників. Автори вважають, що карцинома очеревини може бути одним з клінічних проявів синдрому сімейного раку молочної залози/яєчників [6].

Показано, що носійство патологічного гена **BRCA2** в основному асоціюється з ризиком розвитку раку молочної залози, причому, як для жінок, так і для чоловіків. Для жінок цей ризик складає 55-85%, а для чоловіків - близько 6% []. Крім того, відмічено, що серед чоловіків — носіїв мутації гена **BRCA2** спостерігається підвищена частота раку передміхурової і підшлункової залоз []. Ризик розвитку раку яєчників для носіїв патологічного гена BRCA1 становить 15-27% []

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

Багатьма авторами було показано, що серед євреїв Ашкенази, вихідців з 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) []. У загальній єврейській популяції ці мутації зустрічаються з частотою 0,8, 0,4 і 1,2% відповідно []. Встановлено, що близько 20-30% представниць єврейської популяції, хворих раком молочної залози у віці до 40 років, і 40-60% жінки, що захворіли на рак яєчників, являються носіями однієї з вищезгаданих мутацій, незалежно від їх сімейного анамнезу [].

Серед жінок інших національностей популяційна частота носіїв мутацій гена **BRCA1** і **BRCA2** складає 1:500 і 1:833 жінок відповідно []._

Таким чином, останні досягнення молекулярної генетики істотно розширили уявлення про етіологію і патогенез РОЖРС, але істинна роль відкритих генів залишається поки неясною.

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

Загальну геномну ДНК виділяли з крові згідно стандартного протоколу з використанням протеїнази К та додецилсульфату натрію в якості детергенту .

Для генотипування по гену BRCA1 проводили ампліфікацію відповідного фрагменту ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням розроблених нами пар праймерів RV1001 (5'-

GACGTTGTCATTAGTTCTTTGGTTTG-3') + RV1002 (5'-TGCTGACTTACCAGATGGGAGGACT-3') для мутації 185delAG та RV1003 (5'-CCTGAATGCCTTAAATATGACGTG3')+RV1004(5'GAGCTTTACSTTTCCCGTCCTGGG-3') для мутації 5382insC. Кількість ДНК для проведення ПЛР становила 50 нг на реакцію. Ампліфікацію ДНК проводили в середовищі такого складу: 1× буфер для ПЛР (PCR-buffer, Qiagen, США), MgCl₂ - 2 мМ, суміш dNTP – 0.4 мМ кожного, праймери – 1 мМ 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 у 10% поліакриламідному гелі (Маниатис и др., 1984).

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

Результати та обговорення. Було досліджено розповсюдженість серед населення Чернівецької області двох мутацій у гені BRCA1: 185delAG та 5382insC. Ці дві мутації було обрано для дослідження тому, що згідно із даними літератури

вони підвищують ризик виникнення раку та належать до найбільш поширених серед населення Східної Європи.

Таблиця 1

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

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

В результаті ПЛР-ампліфікації для всіх досліджених зразків ДНК було одержано ПЛР-продукти, розміри яких відповідали очікуваним, а саме – 254 нп для мутації 185delAG та 187 нп – для 5382insC (рисунок 2). На слідую чому етапі експериментів отримані ПЛР-продукти обробляли сумішшю двох рестриктаз кожний. При цьому одна із рестриктаз застосовувалась для ідентифікації поліморфізму у послідовності ДНК (185delAG – рестриктаза Hinf I, 5382insC – рестриктаза Bse I). Введення до

складу реакційної суміші другої рестриктази (відповідно Hind III або Dra I) призводило до появи додаткового рестриктного фрагменту постійної довжини, який являв собою внутрішній контроль для кожного досліджуваного зразка. Результати електрофоретичного розділення продуктів рестрикції, отриманих для 10 пробандів наведено на рисунку 2. Аналогічні результати було отримано і для решта досліджених зразків ДНК. Порівняння наборів отриманих фрагментів свідчить, що серед 40 досліджених пробандів було виявлено одну людину – носія мутації 5382insC у гомозиготному стані (Рис. 2Б, пробанд №8). Носіїв мутації 185delAG виявлено не було.

Загальноприйнято, що скринінгу повинні підлягати кожні 6-12 міс. усі пацієнтки, що відносяться до групи моногенно - детермінованого ризику, починаючи з віку 25 років або на 10 років раніше того віку, в якому розвинулася пухлина у наймолодшого родича першого ступеня спорідненості [16, 29]. 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 включає в себе [78, 94, 96]:

1. Первинну профілактику у вигляді реалізованої репродуктивної функції і дієти з пониженим вмістом жирів тваринного походження.
2. Скринінг, що включає клінічне обстеження молочних залоз, визначення рівня пухлинних маркерів, мамографію та ін.
3. Корекцію гормонального профілю.

Проте незважаючи на розробку нових методів і технологій скринінгу і лікування раку, проблема ранньої діагностики і профілактики спадкових пухлин сьогодні упирається 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 являється створення в загальній системі охорони здоров'я спеціалізованої служби по наданню комплексної онкогенетичної допомоги жіночому населенню. З організаційної точки зору така служба повинна

здійснювати:

- 1) спеціалізовану медико-генетичну консультацію і на її основі - створення онтогенетично реєстру і відбір контингенту осіб зі спадково - обумовленим ризиком розвитку раку органів жіночої репродуктивної системи;
- 2) клінічний моніторинг за станом здоров'я цих осіб з використанням усього арсеналу доступних заходів первинної і вторинної профілактики раку.

Висновки.

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

Література

1. 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.
2. Мендельштам М. Ю. Изучение предрасположенности к развитию злокачественных онкологических заболеваний, обусловленной наследуемыми мутациями в генах BRCA1 и BRCA2 // Молекулярно- биологические технологии в медицинской практике: Сб. науч. трудов. — Новосибирск, 2003. - № 3. - С. 92-109.
3. Зборовская И. Б. Молекулярно-биологические исследования онкогенов и генов-супрессоров в практике клинической онкологии // Канцерогенез. — М.: Медицина, 2004. - С. 361-379
4. Мушкамбаров Н. Н., Кузнецов С. Л. Молекулярная биология. — М.: Мед. информ. агентство, 2003. — С. 535.
5. В.Н. Запорожан . Генетическая генетика 2008.Одесса ст. 222-287
6. Пальцев М. А. (ред.) Введение в молекулярную медицину. — М.: ОАО «Изд. Медицина», 2004. — 496 с.
7. Wf. 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.
8. 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
9. Зорин В., Кербер Р. Прогностическое значение семейного анамнеза для вы-

живаемости онкологических больных // Вопр. онкол. - 2001. - Т. 47, № 4. - С. 396-400.

10.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. - № 41. - 42 с.

11.Любченко Л. Н., Гарькавцева Р. Ф., Поспехова Н. И. и др. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование при наследственной предрасположенности к раку молочной железы / Возможности современной онкологии в диагностике и лечении злокачественных заболеваний. - М., 2003. - С. 44-47.

12.Robson M, Svahn T, McCormick B, et al: Appropriateness of breast-conserving treatment of breast carcinoma in women with germline mutations in BRCA1 or BRCA2: A clinic-based series. Cancer 103:44-51, 2005

13.Brekelmans CT, Seynaeve C, Menke-Pluymers M, et al: Survival and prognostic factors in BRCA1-associated breast cancer. Ann Oncol 17:391-400, 2006

14.Tilanus-Linthorst MM, Bartels KC, Alves C, et al: Selection bias influences reported contralateral breast cancer incidence and survival in high risk non-BRCA1/2 patients. Breast Cancer Res Treat 95:117-123, 2006

15.BRCA1 и BRCA2 у больных раком молочной железы Донецкой области Г.В. Боднарь., И.Е. Седаков,О.В.Кайряк та ин.Медико-соціальні проблеми сімї Том 14 №4 2009 ст.53-58.

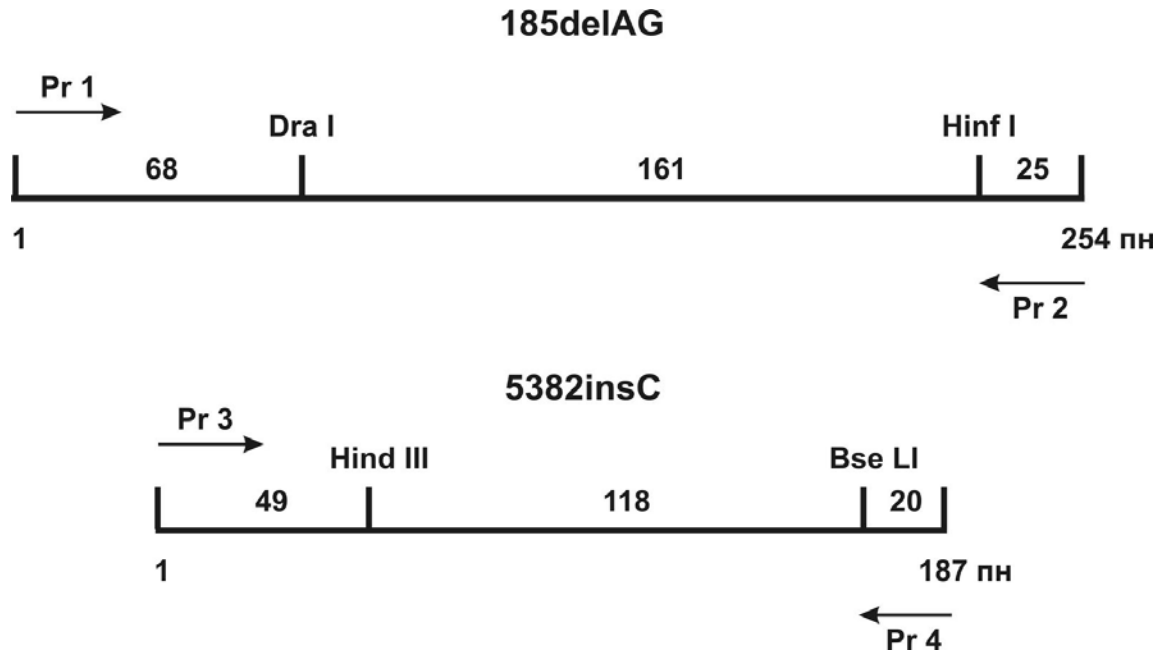


Рисунок 1. Розташування сайтів впізнавання рестриктаз Dra I, Hinf I, Hind III та Bse I у ПЛР-продуктах, отриманих із використанням праймерів Pr1+Pr2 та Pr3+Pr4.

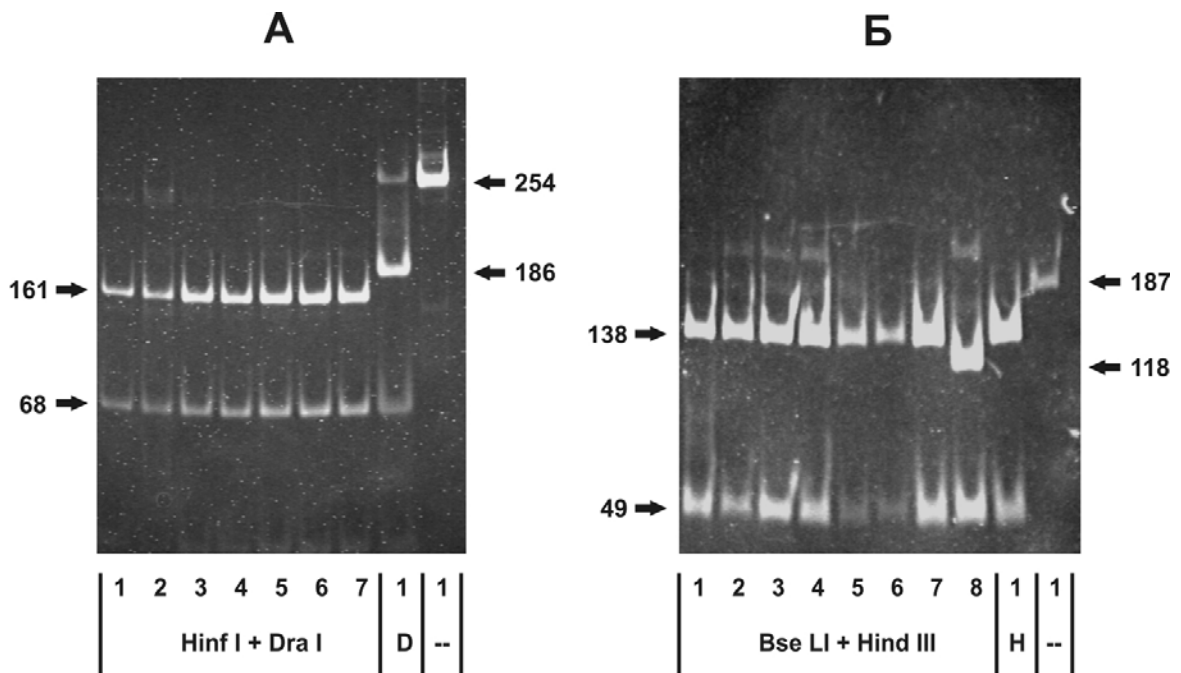


Рисунок 2. Генотипування мутацій 185delAG (А) та 5382insC (Б) у гені BRCA1. Результати електрофоретичного розділення рестриктних фрагментів, які утворилися за дії рестриктаз Hinf I, Dra I (D), Bse I та Hind III (H) на ПЛР-продукти. Цифрами під малюнком позначено номери зразків ДНК.

Молекулярно - генетическое изучение типов мутаций гена BRCA1 у больных раком молочной железы и их родственников Черновицкой области Украины

Т. В. Крук., О.П. Пересунько., Р.А.Волков¹

Буковинский государственный медицинский университет, г. Черновцы, Украина

Черновицкий Национальный университет им. Ю.Федьковича¹

Реферат. Изученная 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.

Molek

«Затверджую»
Проректор з наукової роботи
Буковинського державного
медичного університету, професор
_____ О.І.Іващук
“ ____ ” _____ 2012 року

ЕКСПЕРТНИЙ ВИСНОВОК

про можливість опублікування матеріалів у пресі

та інших засобах масової інформації

Експертна комісія Буковинського державного медичного університету МОЗ України (м.Чернівці), розглянувши статтю:

Т. В. Крук, О.П. Пересунька, Р.А.Волкова «Молекулярно – генетичне вивчення типів мутацій гену BRCA1 у хворих на рак молочної залози та їх родичів Чернівецької області України», підтверджує, що у матеріалі відсутні відомості щодо порушень вимог законодавства України з питань охорони таємної інформації, інтелектуальної та промислової власності, згідно з Положенням 1992 року.

ВИСНОВОК: Даний матеріал може бути опублікований у відкритій пресі.

Голова експертної комісії,
професор

Ю.Є. Роговий

«Затверджую»
Проректор з наукової роботи
Буковинського державного
медичного університету, професор
_____ О.І.Іващук
“ ____ ” _____ 2012 року

ВИСНОВОК

Комісії з питань біомедичної етики

щодо дотримання морально-правових правил проведення медичних наукових
досліджень
(клінічні дослідження)

Комісія з біомедичної етики БДМУ МОЗ України (м. Чернівці) розглянувши статтю Т. В. Крук, О.П. Пересунька, Р.А.Волкова «Молекулярно – генетичне вивчення типів мутацій гену BRCA1 у хворих на рак молочної залози та їх родичів Чернівецької області України» встановила, що дослідження заплановані з дотриманням основних положень GCP (1996 р.) Ковенції Ради Європи про права людини та біомедицину (від 04.04.1997 р.) Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964-2000 рр.) і наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р. на підставі чого дійшла висновку: запропоноване нововведення рекомендоване до впровадження.

*Голова комісії
професор*

І.І. Заморський

Т. В. Крук, О.П. Пересунька, Р.А.Волкова «Молекулярно – генетичне вивчення типів мутацій гену BRCA1 у хворих на рак молочної залози та їх родичів Чернівецької області України» обговорена на засіданні кафедри онкології та радіології 15.02.2012 року (протокол засідання № 3) та рекомендована до друку.

Зав. кафедри онкології
та радіології,
д.мед.н., професор

Іващук О.І.



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
58000, м. Чернівці, Театральна площа, 2, тел./ факс (0372) 55-37-54

“ _____ ” _____ 200__ року _____ № _____

В редакцію журналу
«Новоутворення»

Науковий відділ Буковинського державного медичного університету направляє статтю Т. В. Крук, О.П. Пересунька, Р.А.Волкова «Молекулярно – генетичне вивчення типів мутацій гену BRCA1 у хворих на рак молочної залози та їх родичів Чернівецької області України», для опублікування в журналі «Новоутворення», м. Донецьк.

Проректор з наукової роботи
професор

О.І. Іващук