



Анализ мутации в генах BRCA1 и RCA2 у пациенток с раком молочной железы в эксперименте

Лилияна Минкаировна Саптарова^{1*}, Эльвира Наилевна Когина¹,
Ленара Мухтаровна Хасаншина², Шамиль Нариманович Галимов¹

¹Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия;

²Республиканский клинический онкологический диспансер,

г. Уфа, Россия

Реферат

Цель. Оценка наличия мутаций на основании анализа распространённости полиморфизмов в генах BRCA1 и BRCA2 у пациенток, поступивших на лечение в Республиканский клинический онкологический диспансер Республики Башкортостан с раком молочной железы.

Методы. 137 пациенткам с раком молочной железы в возрасте от 25 до 80 лет поведено молекулярно-генетическое тестирование для выявления мутаций BRCA1 и BRCA2 методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции в реальном времени. В качестве контроля в исследовании использовали венозную кровь 105 здоровых доноров.

Результаты. При исследовании генетических маркёров-модификаторов риска развития рака молочной железы у носителей мутаций BRCA1 и BRCA2 выявлены мутации в генах BRCA1 (185delAG, 4153delA, 5382insC, T300G) и BRCA2 (6174delT), которые помогают определить предрасположенность к наследственным формам рака молочной железы. Обнаружена наиболее часто встречающаяся мутация у пациенток с раком молочной железы — 5382insC в гене BRCA1, составившая 14,59% общего числа обследованных больных и 90% общего числа положительных результатов. Мутации, затрагивающие гены BRCA1 и BRCA2, приводят к синтезу укороченного белка, который не может правильно выполнять свои функции и следить за стабильностью всего генетического материала клетки.

Вывод. Учитывая высокую вероятность развития онкологических заболеваний у носителей мутаций в генах BRCA1 и BRCA2, полученные нами результаты свидетельствуют о целесообразности включения анализа на наличие мутации 5382insC, 4153delA и T300G в ген BRCA1 в скрининговые программы по определению риска рака молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, диагностика, мутации, гены BRCA1 и BRCA2.

Для цитирования: Саптарова Л.М., Когина Э.Н., Хасаншина Л.М., Галимов Ш.Н. Анализ мутации в генах BRCA1 и RCA2 у пациенток с раком молочной железы в эксперименте. *Казанский мед. ж.* 2020; 101 (3): 342–346. DOI: 10.17816/KMJ2020-342.

Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer patients in an experiment

L.M. Saptarova¹, E.N. Cogina¹, L.M. Khasanshina², Sh.N. Galimov¹

¹Bashkir State Medical University, Ufa, Russia;

²Republican Clinical Dispensary of Oncology, Ufa, Russia

Abstract

Aim. To assess the presence of mutations based on the analysis of the prevalence of polymorphisms in the BRCA1 and BRCA2 genes in patients admitted to the Republican clinical Oncology dispensary of the Ministry of Health of the Republic of Bashkortostan with breast cancer.

Methods. 137 patients with breast cancer aged 25 to 80 years underwent molecular genetic testing to detect BRCA1 and BRCA2 mutations by using allele-specific real-time polymerase chain reaction. Venous blood from 105 healthy donors was used as a control group.

Results. The study of genetic modifiers of cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers revealed mutations

in the genes BRCA1 185delAG, 4153delA, 5382insC, T300G and BRCA2-6174 del T, which help identify genetic susceptibility to breast cancer (NSCLC). The most common form of genetic variation in patients with breast cancer was 5382insC mutation in BRCA1 gene, which was 14.59% of the total number of examined patients and 90% of the total number of positive results. BRCA1 and BRCA2 genes mutations lead to producing truncated protein, which cannot properly perform its functions and ensure DNA cell stability.

Conclusion. Considering high breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 genes mutations carriers, our results show the advisability of including screening for 5382insC, 4153delA and T300G mutations in the BRCA1 gene to the screening programs for determining the risk of breast cancer.

Keywords: breast cancer, diagnosis, mutations, BRCA1 and BRCA2 genes.

For citation: Saptarova L.M., Cogina E.N., Khasanshina L.M., Galimov Sh.N. Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer patients in an experiment. *Kazan medical journal*. 2020; 101 (3): 342–346. DOI: 10.17816/KMJ2020-342.

Актуальность. Рак молочной железы (PMЖ) занимает лидирующее место в структуре злокачественных новообразований у женщин Российской Федерации в целом [1]. PMЖ — гетерогенное заболевание, в мире ежегодно регистрируют приблизительно 1 млн новых случаев заболевания [2]. PMЖ представляет с собой злокачественную опухоль железистой ткани молочной железы. Основными причинами развития заболевания считают нарушение генетического и гормонального контроля над ростом клеток в молочной железе, что ведёт к активной пролиферации и разрастанию ткани [3].

По статистике здравоохранения России, у женщин с диагнозом злокачественного новообразования, установленным впервые в жизни, всего зарегистрировано в 2017 г. — 335 275 случаев, в 2018 г. — 338 760 случаев [4]; на 100 тыс. человек в 2017 г. — 425,7, в 2018 г. — 430,3 случая. Выявлено пациенток с диагнозом PMЖ, установленным впервые в жизни, в 2017 г. — 70,6 тыс., в 2018 г. — 70,7 тыс. человек [5]. В 2019 г. все эти показатели увеличились на 1,5%. Возможно, это обусловлено экологическими и экономическими причинами, старением населения и более эффективными методами ранней диагностики.

Проблема онкологических заболеваний стала мировой, и в последние годы большое внимание уделяют диагностике PMЖ с целью выявления генетических маркёров-модификаторов риска развития PMЖ у носителей мутации BRCA1 и BRCA2.

На сегодняшний день клонирован и картирован ряд генов, вовлечённых в канцерогенез при PMЖ, выполняющих функцию генов-супрессоров [6]. В настоящее время известно более 12 тыс. вариаций, и около 5 тыс. из них считают мутациями, ассоциированными с развитием PMЖ. Однако именно для генов BRCA1 и BRCA2 рассчитывают общую пенетрантность для всех мутаций, которые нарушают их функции, и риск развития заболевания может существовать в течение жизни.

Исследование для выявления мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 помогает определить предрасположенность к наследственным формам PMЖ [7]. Патогенетический механизм развития заболевания опосредован нарушением в данных генах репарации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) различной степени пенетрантности. Большинство клинических случаев наследственного PMЖ ассоциировано с мутациями именно в этих генах, которые обеспечивают также защиту организма от трансформированных клеток, провоцирующих появление опухолевых новообразований [8]. В неповреждённом состоянии оба гена (BRCA1 и BRCA2) являются классическими опухолевыми супрессорами, и кодируемые ими белки играют ведущую роль в репарации разрывов двухцепочечных ДНК путём гомологичной рекомбинации [9]. Потеря функциональной активности вследствие врождённых или приобретённых мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 приводит к нарушению регуляции клеточного цикла, процессов дифференцировки и апоптоза, а также к нарастанию хромосомной нестабильности, приводящей к повышению риска развития PMЖ, рака предстательной железы, эндометрия, яичников, меланомы, а также рака грудных желёз у мужчин [10,11].

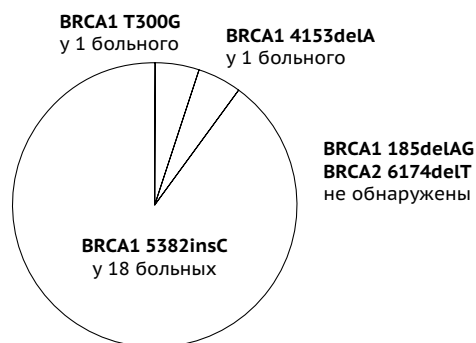
Цель. Оценка наличия мутаций на основании анализа распространённости полиморфизмов в генах BRCA1 и BRCA2 у пациенток с PMЖ.

Материал и методы исследования. В исследовании использовали венозную кровь 137 больных PMЖ в возрасте от 25 до 80 лет, поступивших на лечение в Республиканский клинический онкологический диспансер г. Уфы с января по декабрь 2017 г., а также 105 здоровых доноров.

После ретракции сгустка пробы центрифугировали при 3000 об./мин течение 10 мин, затем сыворотку отбирали в микрокюветы и использовали для исследования. У всех обследуемых

Таблица 1. Исследуемые мутации в генах BRCA1 и BRCA2

Наименование исследования	Мутация	Генотип
BRCA1 (ген, ассоциированный с раком молочной железы 1)	185delAG	Ins/Ins
	4153delA	Ins/Ins
	5382insC	Del/Del
	T300G	T/T
BRCA2 (ген, ассоциированный с раком молочной железы 2)	6174delT	Ins/Ins

**Рис. 1.** Распределение мутаций в генах BRCA1 и BRCA2**Таблица 2.** Частота мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 в эксперименте

Ген	Мутация	Здоровые доноры (n=115)	Пациенты с раком молочной железы (n=137)
BRCA1	185delAG	Не обнаружена	Не обнаружена
	4153delA	Не обнаружена	Обнаружена у 1 (0,73%) больной
	5382insC	Не обнаружена	Обнаружена у 18 (13,14%) больных
	T300G	Не обнаружена	Обнаружена у 1 (0,73%) больной
BRCA2	6174delT	Не обнаружена	Не обнаружена

кровь была получена с их информированного согласия. Исследования были одобрены этическим комитетом Республиканского клинического онкологического диспансера Министерства Здравоохранения Республики Башкортостан.

Молекулярно-генетический анализ (целевые фрагменты геномной ДНК) проводили методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции в реальном времени. Для изучения спектра мутаций и поиска значимости маркеров генетического анализа были выбраны четыре мутации гена BRCA1 и одна мутация гена BRCA2. В качестве материала для анализа использовали ДНК, выделенную из цельной крови, забор которой осуществляли в специальные вакуумные пробирки Green Vac-Tube (Корея) с антикоагулянтом ЭДТА-К2 объемом 5 мл. Исследование проводили с использованием наборов реагентов для выявления мутации в генах BRCA 1 и BRCA2 методом полимеразной цепной реакции (БиоЛинк, Россия) на анализаторе Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Германия).

Результаты. Для исследований выбраны мутации 185delAG, 4153delA, 5382insC и T300G в гене BRCA1, а также мутации 6174delT в гене BRCA2, часто встречающиеся в России.

В гене BRCA1, локализованном на хромосоме 17q21.31, исследовали четыре мутации [11]:

– 185delAG, происходящая за счёт отсутствия двух нуклеотидов аденозинмонофосфата (АМФ) и гуанозинмонофосфата в позиции 185 последовательности ДНК гена;

– 4153delA, происходящая за счёт потери АМФ в позиции 4153 последовательности ДНК гена;

– 5382insC, происходящая за счёт инсерции цитидинмонофосфата в позиции 5382 последовательности ДНК;

– мутация T300G — за счёт замены тимина на гуанин в позиции 300 последовательности гена, в результате которой в белке BRCA1 аминокислота цистеин меняется на глицин, что приводит к нарушению функций белка [12].

В гене BRCA2, локализованном на хромосоме 13q13.1, исследовали мутацию 6174delT, происходящую за счёт делеции тимидинмонофосфата в позиции 6174 [12].

Определяемые мутации в генах BRCA1 и BRCA2, ассоциированных с РМЖ, представлены в табл. 1.

Частота и спектр выявленных мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 у больных РМЖ в сравнении со здоровыми донорами представлены в табл. 2.

Суммарная частота мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 составила 14,59% общего числа обследованных больных. Наиболее часто встречающаяся мутация — 5382insC в гене BRCA1, её частота составила 13,13% общего числа обследованных больных и 90% общего числа положительных результатов. Частота мутаций 4153delA и T300G составила по 0,73% общего числа обследованных больных (рис. 1).

Из рис. 1 видно, что большинство мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 у больных РМЖ,

находящихся на лечении в Республиканском клиническом онкологическом диспансере Министерства здравоохранения Республики Башкортостан, приходится в гене BRCA1 на экзон 20 — 5382insC.

Обсуждение. Белковый продукт гена BRCA1 ингибирует транскрипцию гена рецептора эстрогенов, сдерживая избыточную пролиферацию клеток молочной железы. Первое место по мутации в генах приходится на ген BRCA1 (экзон 20 — 5382insC), где мутация гена заключается в добавлении одного нуклеотида — цитозина в позиции 5382 последовательности ДНК гена. На втором месте стоит мутация в гене BRCA1 (экзон 11P — 4153delA), которая заключается в утрате одного нуклеотида — аденина в позиции 4153 последовательности ДНК, а также 300 T >G (экзон 3 — Cys61Gly), где мутация заключается в замене тимина на гуанин в позиции 300 последовательности. В гене BRCA1 (экзон 2 — 185delAG) мутация, заключающаяся в отсутствии двух нуклеотидов (аденина и гуанина) в позиции 185 последовательности ДНК, у пациенток с РМЖ не обнаружена.

Мутация в гене BRCA2 (6174delT) заключается в потере одного нуклеотида — тимина в позиции 6174 последовательности ДНК, которая участвует в репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и поддержании генетической стабильности. У пациенток с РМЖ, поступивших на лечение в Республиканский клинический онкологический диспансер г. Уфы, эта мутация не обнаружена. Однако проблема остаётся не до конца изученной и представляет большой интерес для проведения исследования с точки зрения генетики.

ВЫВОДЫ

1. В исследовании образцы ДНК 137 пациенток с диагнозом «рак молочной железы» были тестированы на наличие 5 мутаций в генах BRCA1 и BRCA2. Из общего числа больных 20 человек оказались носителями мутации.

2. Суммарная частота мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 у больных раком молочной железы, имеющих указания на наследственный характер заболевания, составляет 14,59% общего числа обследованных больных с диагнозом «рак молочной железы». Доля наиболее часто встречающейся мутации 5382insC в гене BRCA1 составила 13,13%. Частота мутаций 4153delA и T300G в гене BRCA1 составила по 0,73% общего числа обследованных больных.

3. По данным исследований мутации BRCA2-6174delT и BRCA1-185delAG, ни одна

из 137 пациенток с раком молочной железы не была её носителем.

4. Локусы мутаций, обнаруженные у больных раком молочной железы, свидетельствуют о целесообразности включения анализа на наличие мутаций 5382insC, 4153delA и T300G в гене BRCA1 в скрининговые программы по определению риска рака молочной железы и в дальнейшем могут способствовать целенаправленному поиску этих мутаций у родственников.

Участие авторов. Л.М.С. и Л.М.Х. проводили исследования; Э.Н.К. отвечала за сбор и анализ результатов; Ш.Н.Г. — руководитель работы.

Источник финансирования. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

- Ahmad A. Pathways to breast cancer recurrence. *ISRN Oncol.* 2013; 2013: 1–16. DOI: 10.4236/jct.2017.83025 847.
- Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Могушкова Х.А., Кит О.И. Транскрипционный профиль раково-тестикулярных антигенов у больных раком молочной железы. *Мед. иммунол.* 2018; 20 (3): 383–390. [Vodolazhskiy D.I., Kutilin D.S., Mogushkova K.A., Kit O.I. Transcriptional profile of cancer-testicular antigens in patients with breast cancer. *Medical Immunology (Russia)*. 2018; 20 (3): 383–390. (In Russ.)] DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-383-390.
- Лазеров А.Ф., Задонцева Н.С., Гофман А.А. Наследственный рак молочной железы. *Рос. онкол. ж.* 2014; 19 (2): 40–46. [Lazеров A.F., Zadontseva N.S., Gofman A.A. Hereditary breast cancer. *Rossiyskiy onkologicheskii zhurnal.* 2014; 19 (2): 40–46. (In Russ.)]
- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. *Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность)*. М.: ФГБУ «НМИЦ радиологии». 2018; 10–25. [Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2017 godu (zabolevaemost' i smertnost'). (Malignant neoplasms in Russia in 2017 (morbidity and mortality).) Ed. by Kaprin A.D., Starinsky V.V., Petrova G.V. M.: Moscow Federal state budgetary institution "NMIC of radiology". 2018; 10–25. (In Russ.)]
- Федеральная служба государственной статистики. *Здравоохранение в России 2019 г.* М. 2019; 29–39. gks.ru/folder/210/document/13218 (дата обращения: 18.02.2020). [Healthcare in Russia 2019. Statistical Digest. Ed. by The Russian Federal State Statistics Service (Rosstat). Moscow. 2019; 170. <http://gks.ru/folder/210/document/13218> (access date: 18.02.2020). (In Russ.)]
- Гуляев И.С., Чернышёва Н.Ю., Стенкова А.М. и др. Рак молочной железы: риск-ассоциированные мутации гена BRCA1 для скрининга жителей Приморья. *Тихоокеанский мед. ж.* 2018; (1): 44–47. [Gulyan I.S., Chernysheva N.Y., Stenkova A.M. et al. Breast cancer: risk-associated mutations of the BRCA1 gene for screening primorye residents. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal.* 2018; (1): 44–47. (In Russ.)] DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.1.44-47.
- Бойчук С.В., Рамазанов Б.Р. Нарушение системы репарации ДНК — роль в онкогенезе и терапии зло-

качественных новообразований. *Казанский мед. ж.* 2014; 95 (3): 307–314. [Boichuk S.V., Ramazanov B.R. DNA repair system defects — role in oncogenesis and cancer therapy. *Kazan medical journal.* 2014; 95 (3): 307–314. (In Russ.)] DOI: 10.17816/КМЖ1503.

8. Имянитов Е.Н. Биология опухолевого процесса. *Практич. онкол.* 2017; 18 (4): 307–315. [Imyanitov E.N. The biology of tumor growth. *Prakticheskaya onkologiya.* 2017; 18 (4): 307–315. (In Russ.)] DOI: 10.31917/1804307.

9. Имянитов Е.Н. Биология рака молочной железы. *Практич. онкол.* 2017; 18 (3): 221–231. [Imyanitov E.N. Biology of breast cancer. *Prakticheskaya onkologiya.* 2017; 18 (3): 221–231. (In Russ.)] DOI: 10.31917/1803221.

10. Тимербулатов В.М., Егорова Н.Н. *Итоги деятельности Отделения медицинских наук АН РБ за 2014 год.* Уфа: АН РБ Гилем. 2015; 4–30. [Timerbulatov V.M., Egorova N.N. *Itogi deyatelnosti Otdeleniya meditsinskikh nauk AN RB za 2014 god.* (Results of the De-

partment of medical Sciences of the Academy of Sciences of Republic of Bashkortostan for 2014.) Ufa: Academy of Sciences of Republic of Bashkortostan, Gilem. 2015; 4–30. (In Russ.)]

11. Кечин А.А., Боярских У.А., Ермоленко Н.А. и др. *Способ определения нуклеотидных последовательностей экзонов генов BRCA1 и BRCA2.* Патент на изобретение №2612894. Бюлл. от 13.03.2017. [Kechin A.A., Boyarskikh U.A., Ermolenko N.A. et al. *Method for determining nucleotide sequences of exons of the BRCA1 and BRCA2 genes.* Patent for invention №2612894. Issued at 13.03.2017. (In Russ.)]

12. *Онкогенетика BRCA.* М.: ДНК-технология. 2017; 2–11. <http://dna-technology.ru/files/images/broshura/BRCA.pdf> (дата обращения: 18.02.2020). [*BRCA oncogenetics.* Instructions for use. DNA-technology. 2017; 2–11. <http://dna-technology.ru/files/images/broshura/BRCA.pdf> (access date: 18.02.2020). (In Russ.)]