

Н.А. Петрусенко, Е.В. Вереникина, Д.Ю. Якубова,
Н.Н. Тимошкина

МУТАЦИИ В ГЕНАХ *BRCA1/2* У ПАЦИЕНТОК ЮГА РОССИИ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ЯИЧНИКОВ

DOI 10.25789/YMJ.2020.72.21

УДК 616-006.04: 618.11

В статье представлены результаты исследования спектра мутаций в генах *BRCA1/2*, ассоциированных с развитием наследственного рака молочной железы и яичников, у пациенток юга России со злокачественными новообразованиями яичников.

Частота мутаций в генах *BRCA1/2* у обследованных пациенток составила 20,8 %. Распределение типов мутаций с преобладанием 5382insC *BRCA1* соответствует соотношению их встречаемости в популяциях европейских стран. Носителей мутаций *BRCA1/2* регистрировали чаще в группе пациенток с низкодифференцированной серозной карциномой.

Ключевые слова: рак яичников, мутации, *BRCA1/2*, ПЦР.

The article presents the results of a study of the spectrum of mutations in the *BRCA1/2* genes associated with the development of hereditary breast and ovarian cancer in patients of South Russia with malignant ovarian neoplasms.

Mutations in the *BRCA1* gene were determined by real-time PCR: 185delAG, 300T> C, 2080delA, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT; in the *BRCA2* gene - 6174delT in 178 patients with a histologically verified diagnosis of ovarian cancer.

The study included epithelial tumors (malignant) - 98.1%, and granulosa cell tumors - 1.9%. Of the epithelial tumors, the most common was high-grade serous carcinoma (78%). Based on the results of genotyping, the prevalence of germline mutations in the *BRCA1/2* genes was revealed at 20.8%. The higher rate of genetic changes is obviously associated with hereditary history (40% of patients). Of the seven identified mutations, 5382insC (67.6%) was revealed more frequently. All patients confirmed the same mutation in the tumor. There were no cases of somatic changes in *BRCA1/2*. The prevalence of *BRCA1* mutations was noted in the group of patients with low-grade serous carcinoma, in which all cases of mutations in the *BRCA2* gene were identified.

Thus, in patients with OC living in the south of Russia, the mutation frequency in the *BRCA1/2* genes was 20.8%. The distribution of mutation types with predominance of 5382insC *BRCA1* (67.6%) corresponds to the ratio of their occurrence in populations of European countries. *BRCA1/2* mutations were recorded more frequently in the group of patients with high-grade serous carcinoma.

Keywords: ovarian cancer, mutations, *BRCA1/2*, PCR.

Введение. Рак яичников (РЯ) является злокачественной опухолью с самым высоким уровнем смертности среди онкогинекологических заболеваний, что обусловлено большой долей пациенток с поздней стадией заболевания, характеризующейся метастазированием в брюшную полость. Около 10-15% опухолей яичников связаны с наследственными заболеваниями, примерно в 65-85% наследственных карцином яичников обнаруживают мутацию в генах *BRCA1* и *BRCA2*, которые необходимы для ДНК-репарации, а также для поддержания стабильности генома [16]. Пожизненный риск развития РЯ у женщин с мутацией в гене *BRCA1* или *BRCA2* составляет 35-70 и 10-30% соответственно [16]. Суммарный пожизненный риск разви-

тия рака молочной железы и РЯ увеличивается до 85 и 60% соответственно у носителей мутаций в *BRCA1* и *BRCA2* [8]. Сообщается об ассоциации наследственных РЯ с наличием генных aberrаций, связанных с другими наследственными синдромами (мутации в *TP53* при синдроме Li-Fraumeni, гены репарации неспаренных оснований (MMR) при синдроме Линча, гены репарации двунитевых разрывов *BARD1*, *CHEK2*, *RAD51* и *PALB2*) [17].

Цель исследования: изучить спектр мутаций в генах *BRCA1/2*, ассоциированных с развитием наследственного рака молочной железы и яичников, у пациенток юга России со злокачественными новообразованиями яичников.

Материалы и методы исследования. Исследование включало 178 женщин в возрасте 27-71 года с диагнозом рак яичников T1-4N0-1M0-1, гр.2 (стадия I-IV), проходивших плановое лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России в 2015-2019 гг. В ходе опроса пациенток в 71 случае было установлено один или более факторов риска: возраст манифестации до 45 лет, множественные опухоли, билатеральное поражение и отягощенный генеалогический анамнез.

Все пациентки подписали информированное согласие на обработку персональных данных и передачу сведений, составляющих врачебную тайну, а также на передачу биологического материала.

Материалом для исследования была венозная кровь с ЭДТА и парафиновые блоки с опухолевой тканью яичников. Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов цельной крови и образцов опухоли в парафиновых блоках набором «ДНК-сорб-В» (AmpliSens). Для выделения ДНК из парафиновых блоков (тканевые образцы, фиксированные в 10%-ном забуференном формалине) получали 5-8 слайсов толщиной 3 мкм с помощью микротомы, депарафинизировали о-ксилолом и 95%-ным этиловым спиртом, лизировали в 200 мкл лизирующего раствора с добавлением 20 мкл протеиназы К (10 мг/мл) при температуре 58°C в течение ночи, затем прогревали при температуре 90°C в течение 1 ч для устранения ДНК-белковых сшивок, далее проводили очистку набором «ДНК-сорб-В» согласно инструкции.

Детекцию мутаций производили методом ПЦР в режиме реального времени набором «ОнкоГенетика BRCA» (ДНК-технология). Для всех

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону: ПЕТРУСЕНКО Наталья Александровна – м.н.с., petrusenko-natulya@mail.ru, ВЕРЕНИКИНА Екатерина Владимировна – к.м.н., зав. отд. гинекологии, petrusenko-natulya@mail.ru, ЯКУБОВА Дарья Юрьевна – врач-онколог, darayakubova@yandex.ru, ТИМОШКИНА Наталья Николаевна – к.б.н., зав. лаб., timoshkinann@mioi.ru.

пациенток определяли мутации в гене *BRCA1*: 185delAG, 300T>C, 2080delA, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT; в гене *BRCA2* – 6174delT. Учет и интерпретацию результатов реакции осуществляли автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором "ДТпрайм" 5M1 (ООО "НПО ДНК-Технология", Россия).

Статистический анализ результатов выполняли с использованием пакета прикладных статистических программ Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, США) и Statistica 8.0 (Stat Soft Inc., США). Оценку различий давали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, сравнение частот признаков проводили с помощью критерия χ^2 .

Результаты и обсуждение. Для всех 178 больных РЯ были получены данные по генотипированию ДНК, экстрагированной из крови и операционного материала. Различий между мутационным статусом в крови и опухолевом материале зафиксировано не было. Распределение мутаций в генах *BRCA1/2* по возрастным группам пациенток представлено в табл. 1.

Анализ возрастной характеристики больных РЯ показал, что средний возраст манифестации заболевания при

диком типе генов *BRCA1/2* составил 52,4 года, для мутантного типа – 54 года. В итоге различий по возрасту манифестации между двумя группами в зависимости от статуса гена *BRCA1/2* обнаружено не было ($U=-0,133$ при $p=0,894$). Однако ранжирование пациенток с разным мутационным статусом по возрастным группам позволило выявить статистически значимые отличия ($\chi^2=18,47$ при $p<0,01$). Таким образом, носители мутаций чаще встречались в возрасте 45-64 лет, тогда как в группе старше 65 лет преобладали пациентки с диким типом генов *BRCA1/2* (табл.1).

Мутации в генах *BRCA1/2* обнаружены у 37 (20,8%) больных РЯ. Герминальная мутация в гене *BRCA1* выявлена у 35 женщин, а в гене *BRCA2* – у 2 женщин. Из восьми идентифицируемых мутаций у больных РЯ было обнаружено шесть типов (табл.2). Самой частой (67,6%) была мутация в гене *BRCA1* - 5382insC.

Известно, что РЯ является гетерогенным заболеванием и морфологически, и молекулярно-генетически. Большинство видов РЯ классифицируются как эпителиальные (90%), гистологические подтипы которого включают серозные (68-71%), эндометриоидные (9-11%), светлоклеточные (12-13%), муцинозные (3%), злокачественные

опухоли Бреннера (1%) и смешанные карциномы (6%) [12]. Учитывая генетический профиль, серозные карциномы, в свою очередь, подразделяются на высокодифференцированную серозную карциному низкой степени злокачественности, куда входят опухоли, ассоциированные с пограничным поражением в виде фона, аденокарциномы, классифицируемые как G1 (генетический тип I), и низкодифференцированную серозную карциному высокой степени злокачественности, объединяющую опухоли, определяемые как G2 и G3 (генетический тип II) [1, 2].

В настоящем исследовании гистологически были подтверждены эпителиальные опухоли (злокачественные) в 98,1% случаев и гранулезоклеточные опухоли взрослого типа - 1,9%. Из эпителиальных опухолей самой частой была низкодифференцированная серозная карцинома (78%).

Согласно полученным данным основная доля мутации в гене *BRCA1* была обнаружена в самой многочисленной группе низкодифференцированных серозных карцином (67,6%), а мутации в гене *BRCA2* были идентифицированы только в этой группе (табл. 2). Однако статистически значимых различий по мутационному статусу между разными гистологическими подтипами обнаружено не было (табл. 3).

Гены *BRCA1/2* играют важную роль в поддержании целостности ДНК, участвуя в репарации двунитевых разрывов путем гомологичной рекомбинации, которая, будучи нарушенной, ответственна за накопление геномных изменений и окончательную геномную нестабильность [4]. Идентификация патогенных мутаций позволила определить механизмы развития патологии, а также спрогнозировать риски для носителей герминальных мутаций.

Таблица 1

Статус генов *BRCA1/2* в разных возрастных группах больных РЯ, %

Возрастная группа*	Дикий тип	Мутантный тип
<34	11,5	0
35-44	19,2	11,1
45-54	15,4	44,4
55-64	23,1	29,6
>65	30,8	14,8
χ^2 (p)	18,47 (<0,01)	

*Указан возраст при постановке первичного диагноза.

Таблица 2

Частота генотипов с мутантным аллелем генов *BRCA1/2* у пациенток с разным гистологическим типом РЯ, %

Определяемые мутации		Низкодифференцированная серозная карцинома	Высокодифференцированная серозная карцинома	Смешанные эпителиальные опухоли
<i>BRCA1</i>	185delAG	2,7 (1/37)	0	0
	4153delA	13,5 (5/37)	0	0
	5382insC	41,1 (15/37)	13,5 (5/37)	13,5 (5/37)
	3819delGTAAA	0	0	0
	3875delGTCT	0	0	0
	300T>C	2,7 (1/37)	0	0
	2080delA	8,1 (3/37)	0	0
<i>BRCA2</i>	6174delT	5,4 (2/37)	0	0

Таблица 3

Статус генов *BRCA1/2* при различных гистологических типах РЯ, %

Гистологический подтип РЯ	Дикий тип	Мутантный тип
Низкодифференцированная серозная карцинома	50,6	15,2
Высокодифференцированная серозная карцинома	15,2	2,8
Муцинозные опухоли	4,5	0
Эндометриоидные опухоли	6,2	0
Смешанные эпителиальные опухоли	1,7	2,8
Гранулезоклеточная опухоль взрослого типа	1,1	0
Всего	79,2	20,8
χ^2 (p)	9,377 (>0,05)	

Если общепопуляционный риск овариально-маточного рака составляет в среднем 1-2%, то в семьях, где идентифицированы мутации в этих генах, риск увеличивается до 39 - 63% для *BRCA1* и 16-27% для *BRCA2* [8].

В нашем исследовании мутации в генах *BRCA1/2* обнаружены у 20,8% больных РЯ. Повышенная частота генетических изменений, очевидно, связана с обогащением выборки случаями с отягощённым наследственным анамнезом (40% пациенток). Для всех лиц, несущих патогенные мутации в этих генах, было назначено генетическое консультирование для формирования групп высокого риска развития рака молочной железы, РЯ, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы и других опухолей [6, 11, 14]. В ходе клинического наблюдения у 2 больных (5,4%) было отмечено формирование опухолей другой локализации.

Результаты генетического тестирования *BRCA* имеют важное значение для больных РЯ, например, в качестве прогностического биомаркера ответа на специфическое противоопухолевое лечение [5]. Исследования показали, что пациентки с положительным тестом на патогенные варианты *BRCA1/2* проявляют повышенную чувствительность к комбинированной терапии, содержащей производные платины, и демонстрируют более высокую чувствительность к лечению ингибиторами PARP по сравнению с пациентками, не имеющими таких вариантов [5]. Неспособность восстановить вызванное химиотерапией повреждение ДНК дает значительно лучший прогноз у *BRCA*-положительных пациенток с прогрессирующим заболеванием по сравнению с пациентками с диким типом. *BRCA*-положительные больные РЯ имеют риск развития вторичных раковых заболеваний. *BRCA*-положительный

тест у больных РЯ также имеет важное значение для оценки риска развития рака и его профилактики среди родственников [5].

В последнее время в ряде исследований было продемонстрировано, что распространенность наследственных патогенных вариантов и оценки геноспецифического риска могут меняться не только на основании семейного анамнеза и типа/молекулярного подтипа опухолей, но и на основании расовой и этнической принадлежности и различного географического места проживания [3, 7, 13]. В нашей работе распределение частоты мутаций гена *BRCA1* (табл. 2) в целом соответствовало таковому для европейских стран, самая распространенная мутация 5382insC встречалась с такой же частотой, как и в ранее опубликованных данных (67,6% vs 68,3%) [10].

Выводы. Таким образом, в настоящем исследовании у больных РЯ, проживающих на юге России, частота мутаций в генах *BRCA1/2* составила 20,8 %. Распределение типов мутаций с преобладанием 5382insC *BRCA1* (67,6%) соответствует соотношению их встречаемости в популяциях европейских стран. Носителей мутаций в генах *BRCA1/2* регистрировали чаще в группе пациенток в возрасте 45-64 лет с низкодифференцированной серозной карциномой.

Литература

1. Франк Г.А. Новая классификация опухолей яичников / Г.А. Франк, Л.В. Москвина, Ю.Ю. Андреева // Архив патологии. – 2015. – №4. – С. 40-50.
2. Frank G.A., Moskvina L.V., Andreeva Yu.Yu. A new classification of ovarian tumors. Pathology archive. 2015;4:40-50]. doi: 10.17116/patol201577440-50.
3. Цандекова М.Р. Молекулярная характеристика серозной аденокарциномы яичника: значение для диагностики и лечения / М.Р. Цандекова, Н.В. Порханова, Д.С. Кутилин //

Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 1.

Tsandeskova M.R., Porkhanova N.V., Kutilin D.S. Molecular characteristic of serous ovarian adenocarcinoma: implications for diagnosis and treatment. Modern problems of science and education. 2020;1]. DOI:10.17513/spno.29428. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29428>.

3. Akbari M.R., Gojska N., Narod S.A. Coming of age in Canada: A study of population-based genetic testing for breast and ovarian cancer. Curr. Oncol. 2017; 24:e282. doi: 10.3747/co.24.3828.

4. Auguste A., Leary A. Abnormalities of DNA repair and gynecological cancers. Bull. Cancer. 2017;104(11):971–980.

5. Gori S., Barberis M., Bella M.A., et al. Recommendations for the implementation of *BRCA* testing in ovarian cancer patients and their relatives. Crit. Rev. Oncol./Hematol. 2019;140:67–72. doi: 10.1016/j.critrevonc.2019.05.012.

6. Hu C., Hart S.N., Polley E.C., et al. Association Between Inherited Germline Mutations in Cancer Predisposition Genes and Risk of Pancreatic Cancer. Jama. 2018; 319:e2401. doi: 10.1001/jama.2018.6228.

7. Manchanda R., Loggenberg K., Sanderson S., et al. Population Testing for Cancer Predisposing *BRCA1/BRCA2* Mutations in the Ashkenazi-Jewish Community: A Randomized Controlled Trial. JNCI J. Natl. Cancer Inst. 2015;107. doi: 10.1093/jnci/dju379.

8. Mavaddat N., Peock S., Frost D., et al. Cancer risks for *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers: results from prospective analysis of EM-BRACE. J. Natl. Cancer Inst. 2013;105(11):812–822. doi: 10.1093/jnci/djt095.

9. Menon U., Karpinsky C., Gentry-Maharaj A. Ovarian Cancer Prevention and Screening. Obstet. Gynecol. 2018;131:909–927. doi: 10.1097/AOG.0000000000002580.

10. Petrusenko N.A., Timoshkina N.N., Vashchenko L.N., et al. *BRCA1/2* and *CHEK2* mutation prevalence in patients with breast and/or ovarian cancer in the South of Russia. J. Clin. Oncol. 2020;e13088. DOI:10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.e13088.

11. Pilarski R. The Role of *BRCA* Testing in Hereditary Pancreatic and Prostate Cancer Families. Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book. 2019:79–86. doi: 10.1200/EDBK_238977.

12. Rojas V., Hirshfield KM, Ganesan S, Rodriguez-Rodriguez L. Molecular Characterization of Epithelial Ovarian Cancer: Implications for Diagnosis and Treatment. Int J Mol Sci. 2016 Dec 15;17(12):2113. doi: 10.3390/ijms17122113.

13. Rowley S.M., Mascarenhas L., Devereux L., et al. Population-based genetic testing of asymptomatic women for breast and ovarian cancer susceptibility. Genet. Med. 2018;21:913–922. doi: 10.1038/s41436-018-0277-0.

14. Shindo K., Yu J., Suenaga M., et al. Deleterious Germline Mutations in Patients with Apparently Sporadic Pancreatic Adenocarcinoma. J. Clin. Oncol. 2017;35:3382–3390. doi: 10.1200/JCO.2017.72.3502.

15. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer Statistics, 2015. CA Cancer J. Clin. 65, 5–29. 10.3322/caac.21254.

16. Testa U., Petrucci E., Pasquini L., et al. Ovarian Cancers: Genetic Abnormalities, Tumor Heterogeneity and Progression, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. Medicines (Basel). 2018 Feb 15;5(1):16. doi: 10.3390/medicines5010016. PMID: 29389895; PMCID: PMC5874581.

17. Toss A., Tomasello C., Razzaboni E., et al. Hereditary ovarian cancer: not only *BRCA 1* and *2* genes. Biomed Res Int. 2015;2015:341723. doi: 10.1155/2015/341723.