

STUDIUL FRECVENȚEI ȘI SPECTRULUI MUTAȚIILOR GENELOR BRCA1/2 LA PACIENȚII CU NEOPLAZII MALIGNNE PRIMAR MULTIPLE.

Irina TRIPAC, d.m., Valentina STRATAN, doctor în biologie

IMSP Institutul Oncologic din Republica Moldova

Rezumat

Mutațiile germinale ale genelor BRCA1 și BRCA2 condiționează predispoziția spre cancer mamar și ovarian în 80-90% din cazuri, formând, sindromul cancerului mamar familial și sindromul cancer mamar/ovarian familial. De asemenea, s-a stabilit că în familiile cu mutațiile genice BRCA1 posibilitatea apariției cancerului ovarian este mai mare, în timp ce mutațiile de gene BRCA2 sunt caracteristice familiilor cu afecțiuni doar de cancer mamar [2]. Riscul apariției cancerului ovarian la rudele persoanelor afectate de cancer mamar este de 2-3 ori mai mare, decât în cazul populației. Este deja demonstrat, că genotipul patologic BRCA1/2 crește probabilitatea de apariție a cancerului endometrial și de colon. Studiul clinic al probanzilor cu NMPM, cu sindroame ereditare și al datelor lor genealogice a făcut posibilă identificarea caracteristicilor clinice bine determinate și tipul dominant de transmitere ereditară.

Cuvinte-cheie: neoplaziile maligne primar multiple, mutațiile genelor BRCA1/2, cancer endometrial, cancer ovarian.

Summary. Study of the frequency of the brca1 / 2 gene mutation spectrum in patients with primary-multiple malignant neoplasia.

Genetic testing of the predisposition, in this case, mutations of the BRCA 1 and BRCA 2 genes, allows you to confirm the genetic diagnosis, assess the risk of developing malignant neoplasms and develop individual approaches to the early diagnosis, prevention and treatment of patients from “genetic risk groups”.

We have characterized the spectrum of mutations and polymorphisms of the BRCA predisposition genes in probands suffering from a hereditary form of endometrial cancer and healthy patients from cancer-burdened families. A high frequency of 5382 insC mutations in the population was shown.

Key-words: primary multiple malignant neoplasms, gene mutations BRCA1/2, endometrial cancer, ovarian cancer.

Резюме. Изучение частоты спектра мутации генов brca1/2. У пациенток с первично-множественными злокачественными новообразованиями.

Генетическое тестирование предрасположенности, в данном случае мутаций генов BRCA 1 и BRCA 2, позволяет подтвердить генетический диагноз, оценить риск развития злокачественного новообразования и разработать индивидуальные подходы к ранней диагностике, профилактике и лечению пациентов из «групп генетического риска».

Нами охарактеризован спектр мутаций и полиморфизмов генов предрасположенности BRCA у пробандов, страдающих наследственной формой рака эндометрия и здоровых пациентов из онкологически отягощенных семей. Показана высокая частота мутации 5382 insC в популяции.

Ключевые слова: первично-множественные злокачественные новообразования, мутации генов BRCA 1 și 2, рак эндометрия, рак яичников.

Introducere.

Este cunoscut faptul, că mutațiile germinale ale genelor BRCA1 și BRCA2 condiționează predispoziția spre cancer mamar și ovarian în 80-90% din cazuri, formând, sindromul cancerului mamar familial și sindromul cancer mamar/ovarian familial. De asemenea, s-a stabilit că în familiile cu mutațiile gene BRCA1 posibilitatea apariției cancerului ovarian este mai mare, în timp ce mutațiile de gene BRCA2 sunt caracteristice familiilor cu afecțiuni doar de cancer mamar [2]. Riscul apariției cancerului ovarian la rudele persoanelor afectate de cancer mamar este de 2-3 ori mai mare, decât în cazul populației. Este deja demonstrat, că genotipul patologic BRCA1/2 crește probabilitatea de apariție a cancerului endometrial și de colon. Studiul clinic al probanzilor cu NMPM, cu sindroame ereditare și al datelor lor genealogice a făcut posibilă identificarea caracteristicilor clinice bine determinate și tipul dominant de transmitere ereditară. Aceste sindroame reprezintă rezultatul unor mutații specifice ereditare, care determină riscul de dezvoltare a cancerului la 50% din descendenți cu afectarea organelor asociate acestor sindroame [2].

Unele din sindroamele genetice identificate, cu excepția vârstei precoce la momentul manifestărilor bolii, au o afinitate specifică clinică de afectare prin tumoră primară malignă a unor anumite regiuni anatomice cu risc crescut în această patologie. Într-o parte din acestea s-a constatat afectarea aceleiași organ de cel de al doilea neoplasm primar [1].

Trebuie menționat, că cel mai vast s-a dovedit a fi grupul cu sindrom de cancer colorectal nepolipos ereditar (CCNPE) (sau sindromul Lynch) [3-7].

Materiale și metode.

Prin metoda de hibridizare alelă specifică elaborată, care îmbină reacția în lanț a polimerazei multiple PCR și hibridizarea cu biocip oligonucleotid,

s-a determinat frecvența de apariție a opt mutații în genele BRCA1/2 (185delAG, 300T>G, 4153delA, 4158A>G și 5382insC în gena BRCA1, 695insT și 6174delT în gena BRCA2 la pacienții cu NMPM din rândul populației feminine. La fiecare pacient diagnosticul a fost verificat prin examen histologic și s-a obținut consimțământul informat al fiecărui pacient pentru participarea în studiu.

Extracția de ADN genomic din limfocitele sângelui periferic s-a realizat folosindu-se metoda fenol-cloroform standard. Primerii, pentru amplificarea acestor fragmente, au fost selectați cu programul „Oligo 6” (MBI, SUA). Specificitatea primerilor a fost verificată cu programul „Nucleotide - nucleotide BLAST” („NCBI”, SUA).

Amplificarea ADN pentru analiză pe biocip s-a efectuat prin amplificarea simultană a patru zone ale genei BRCA1 și a două zone ale genei BRCA2. În fiecare etapă a PCR se foloseau două tipuri de reacție. În primul tip se produceau fragmente de exoni 2,5 și 20 din gena BRCA1, în al doilea - se produceau fragmente de exoni 11 din gena BRCA1, exonii 5 și 11 din BRCA2. Produsele PCR au fost detectate prin electroforeză în gel de agaroză de 2%.

Diferite tipuri de neoplasme, întâlnite în asociere la femei, au servit drept premisă pentru studiul asocierii frecvenței și spectrului mutațiilor germinale ale genelor BRCA1/2 cu instalarea afectării primar multiple cu implicarea ovarelor.

Studiul s-a efectuat cu utilizarea biocipurilor, elaborate în Institutul de Biologie Moleculară „V. A. Engelhardt” (Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта), și a inclus 12 de paciente cu diagnosticul de NMPM. La 7 din ele prima tumoră primară a fost cancerul ovarian, la 5 – CO a fost a

doua tumoră primară. Vârsta acestor paciente, în mediu, a constituit $49,1 \pm 12,1$ de ani și a variat de la 27 până la 76 de ani.

Pentru aprecierea preciziei metodei, biocipul care conținea 8 mutații, a fost testat cu utilizarea a 37 de mostre de ADN de control. Rezultatele hibridizării pe biocip la verificarea mostrelor de control, purtătoare de mutații ale genei BRCA1, coincideau cu rezultatele obținute prin metoda SSCP pentru secvențierea directă (datele nu sunt prezentate).

Caracteristicile clinice ale acestor pacienți sunt prezentate în *tabelul 1*.

Tabelul 1.

Caracteristica pacienților cu NMPM

Diagnosticul clinic	Numărul de pacienți	Vârsta la diagnosticarea maladiei (medie)
NMPM cu afectarea ovarelor, inclusiv	12	$49,4 \pm 12,1$
CO + cancer mamar	10	
CO + cancer endometrial	2	

Rezultate și discuții.

La pacientele cu NMPM cu afectarea ovarelor au fost identificate 7 cazuri de mutații în gena BRCA1 (52,63%). Datele obținute confirmă faptul, că femeile cu mutații ale genei BRCA1 sunt expuse unui risc sporit de dezvoltare a NMPM. Tipurile acestor mutații sunt prezentate în *tabelul 2*.

Tabelul 2.

Tipurile mutațiilor genei BRCA1 depistate la 7 din 12 de paciente, la care una din tumorile primare a fost cancerul ovarian

Localizarea tumorii	Mutația genei BRCA1	Numărul de cazuri
CO - CM	5382insC (exon 20)	3
	4153delA (exon 11)	1
	185delAG (exon 2)	1
	300T>G (exon 5)	2

După cum se poate observa din tabel, la pacienții cu NMPM au fost depistate 4 tipuri de mutații în gena BRCA1, și anume: 5382insC (exon 20), 300T>G (exon 5), 185delAG (exon 5) și 4153delA (exon 11). Din 12 de pacienți cu NMPM, în 7 cazuri (36,84%) mutațiile au fost depistate la pacienții cu afectare asociată prin CO și CM. La pacientele cu NMPM mutația 5382insC a fost cea mai frecventă, ponderea ei constituind 54,5%.

Vârsta medie a pacientelor cu NMPM – purtătoare de mutații ($43,0 \pm 5,8$ ani), a fost mai tânără, decât vârsta pacientelor ($56,6 \pm 13,7$ ani), la care nu s-au depistat mutații ($p \leq 0,001$).

În caz de prezență a mutațiilor în gena BRCA1, vârsta manifestării maladiei, în mediu, este mult mai tânără, decât la pacientele fără aceste mutații. În plus, vârsta medie la pacientele cu NMPM – purtătoare de mutații ($43,0 \pm 5,8$ ani) a fost mai tânără, decât vârsta la pacientele cu CO solitar din populație ($48,5 \pm 10,1$ ani). Aceasta corespunde datelor privind frecvența mutațiilor acestor gene în caz de CO, obținute în alte populații.

Analiza datelor genealogice ale pacientelor cu NMPM, a permis de a constata că în familiile a trei paciente cu prezența mutației 5382insC și existența tumorilor primare în glanda mamară și ovare, doar în una din familii nu au existat date despre afectarea rudelor. În cea de a doua familie – a fost identificat sindromul CM/CO, iar în a treia familie, mama pacientei era afectată de CM. În familia pacientei cu mutația 185delAG s-a urmărit afectarea prin CO în trei generații (*figura 1*).

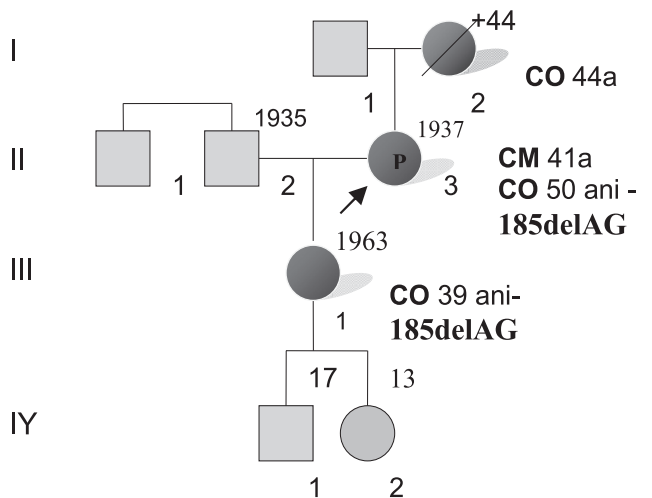


Figura 1. Arborele genealogic al pacientei O, mutația 185delAG (sindromul familial al CO organo-specific).

La pacientă s-a diagnosticat CM la vârsta de 41 ani, CO la vârsta de 50 ani, la fiică (II-1) s-a constatat cancer al ambelor ovare la vârsta de 40 ani, mama pacientei (I-2) a decedat de CO la vârsta de 44 ani. Mutația în exonul 2 al genei BRCA1 - 185delAG a fost depistată la mamă (I-2) și fiică (II-1), la copii (IV-1,2) aceasta nu a fost identificată.

În familia pacientei cu mutația 4153delA, în afară de CO care a afectat trei generații, este depistat CM, cancer de prostată și pulmonar (*figura 2*).

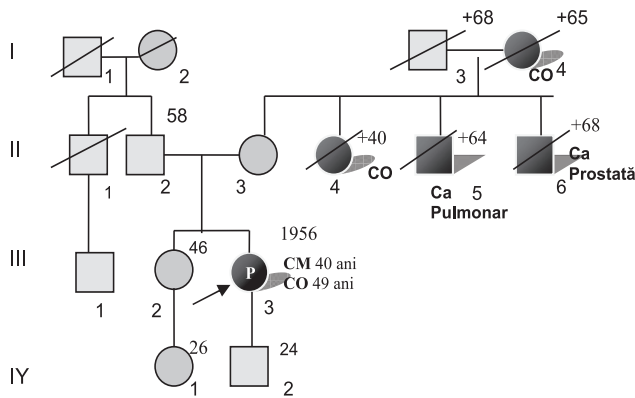


Figura 2. Arborele genealogic al pacientei J., cancer familial organo-specific ovarian (mutația 4153delA).

La pacientă s-a depistat mutația 4153delA (exon 11), CM a fost diagnosticat la vârsta de 40 ani, CO la vârsta de 49 ani, la mătușă (II-4) a fost diagnosticat CO, a decedat la 40 de ani, moșul (II-5) a decedat de cancer pulmonar, moșul (II-6) a decedat de cancer de prostată la vârsta de 68 ani.

Se pare că defectul ereditar al genei BRCA1 sporește riscul de dezvoltare nu doar a CM și CO. Alte tumori, cum ar fi cancerul de prostată, pancreas, melanomul sunt asociate cu mutații ale genelor BRCA1.

În familiile cu mutații germinale 300T>G ale genei BRCA1, rudele nu sunt doar afectate de cancerul organelor reproductive feminine, dar și de cancerul tractului gastrointestinal, de prostată, laringe și chiar de boala mielomică (figura 3). În fiecare din aceste familii a fost diagnosticat sindromul familial CM/CO.

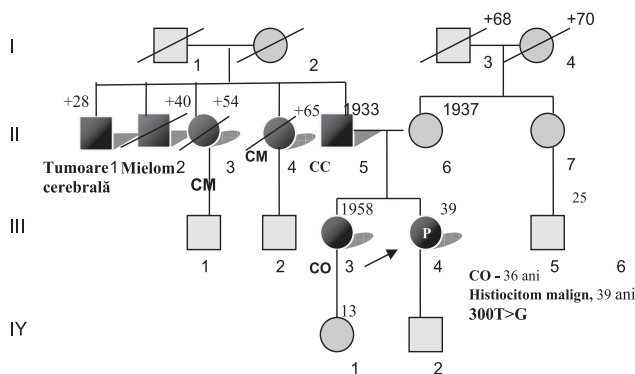


Figura 3. Arborele genealogic al pacientei A., mutația 300T>G (exon 5)

La pacientă (III-4) a fost depistată mutația 300T>G (exon 5), la 36 ani s-a diagnosticat CO, la 39 - histiocitom malign ale hemitoracelui drept, la tată (II-4) a fost rezecat cancerul de intestin rect la vârsta de 58 ani, la mătușă (II-3) CM, (II-2) CM, moșul (II-2) a avut mielom, a decedat la 40 ani, moșul (II-1) a avut tumoră cerebrală, a decedat la vârsta de 28 ani, sora urmează tratament pentru CO (diagnosticul mutațiilor nu s-a efectuat) (figura 4).

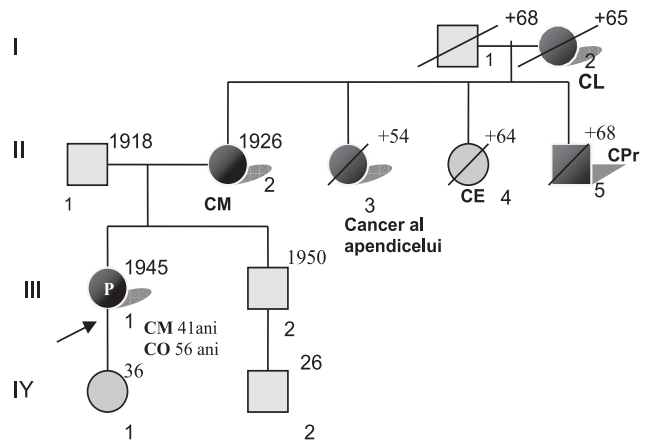


Figura 4. Arborele genealogic al pacientei M. (mutația 300T>G, exon 5).

La pacientă (III-1) a fost depistată mutația 300T>G (exon 5), diagnosticul de CM a fost confirmat la vârsta de 41 ani, +CO la vârsta de 56 ani, la mamă (II-2) a fost operat CM la vârsta de 60 ani, la moș (II-3) s-a stabilit cancer apendicular la vârsta de 48 ani, la mătușă (II-4) s-a diagnosticat cancer endometrial la vârsta de 48 ani (a decedat la 64 ani), moșul (II-5) a avut cancer de prostată, a decedat la vârsta de 68 ani, bunica (I-2) (figura 5).

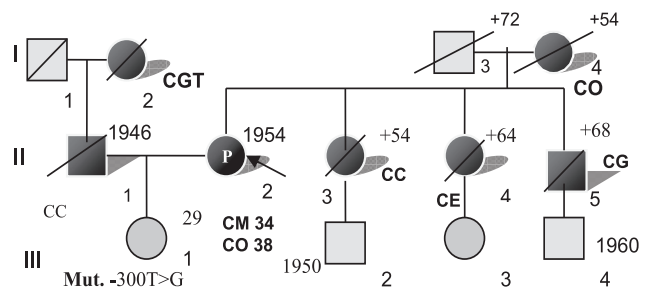


Fig. 5. Arborele genealogic al pacientei H. Diagnosticul: CM+CO, (mutația 300T>G).

La pacientă (II-2) a fost constată mutația 300T>G (exon 5), diagnosticul: CM la vârsta de 34 ani, CM la vârsta de 38 ani, la mamă (I-4) a fost depistat CO, a decedat la vârsta de 54 ani, la frate (II-3) a fost diagnosticat cancer de intestin gros, sora (II-4) a fost diagnosticată cu cancer endometrial, fratele (II-5) – cu cancer laringian, la fiică (III-1) s-a depistat mutația 300T>G.

Din datele prezentate este remarcabil faptul că, la un individ mutația 5382insC a genei BRCA1 (exon 20) se asociază cu riscul de dezvoltare a CO, concomitent cu CM primar, sau cu cancer primar al glandei tiroide, rinichiului, sau melanom (tabelul 38). Studiul arborilor genealogici ai pacientelor cu NMPM purtătoare de mutații în gena BRCA1 a demonstrat, că în familiile pacienților cu mutația germinală 5382insC,

rudetele sunt afectate de cancer al organelor reproductiv-feminine, de prostată și de melanom cutanat. În familiile pacienților purtători ai mutației 300T>G (exon 5) a genei BRCA1, membrii familiilor, în afară de cancer al organelor reproductiv-feminine, de prostată, deseori sunt afectați de cancer al tractului gastro-intestinal. În timp ce în caz de alte tipuri de mutații ale genei BRCA1, rudetele mai frecvent sunt afectate de cancer cu aceeași localizare anatomică și/sau cu CM.

Actualmente, este stabilit că funcția genelor BRCA1,2 rezidă în menținerea integrității genomului și produsele acestor gene joacă un rol primordial în transmiterea semnalelor despre alterarea ADN, în activarea reparației ADN, în inducția apoptozei.

Există presupunerea, că reducerea funcției sau inactivarea genelor BRCA 1, 2 conduce la instabilitate cromozomială, care se manifestă prin diferite dereglări de replicări cromozomiale, ceea ce, la rândul său, duce la mutații ulterioare. Reieșind din aceste date, se poate presupune că prezența defectelor în aparatul de reparație a mutațiilor ADN, care este urmată de amplificarea instabilității cromozomiale corespunzătoare și creșterea probabilității mutațiilor multiple, stă la baza formării riscului de dezvoltare a CM, CO și, se pare că, și a altor neoplasme, inclusiv de prostată și ale tractului digestiv. În unul din acești arbori genealogici a fost demonstrată co-segregarea CO și melanomului cutanat. Posibil, în aceste familii, factorii provocatori ai mediului ambiant și pierderea funcției genei BRCA1 sunt critice pentru manifestarea acestor tumori. În afară de aceasta, se cunoaște că pentru formele ereditare de melanom cutanat, de asemenea, este caracteristică instabilitatea cromozomială.

La diagnosticul mutațiilor ereditare ale genelor BRCA1/2, din 5 pacienți cu afectare primară multiplă cu cancer mamar, doar la una s-a depistat mutația 6174delT în gena BRCA2. La 4 a fost constatată mutația 5382insC a genei BRCA, trei din ele au avut CM bilateral și una - cancer primar multiplu al glandei mamare și pulmonar. În una din familiile acestor pacienți, existau rude afectate prin CM și CO. În cea de a doua familie - doi moși pe linia mamei au decedat de cancer al intestinului gros și în cea de a treia - indicatorii privind afectarea prin neoplasme a rudelor lipseau. În cea de a patra familie a unei paciente cu CM primar depistat la vârsta de 48 ani și adenocarcinom al segmentului inferior pulmonar drept la vârsta de 49 ani, din toate rudetele, doar la mamă a fost depistat CM la vârsta de 53 ani. Mutația 6174delT în gena BRCA2 a fost depistată la o pacientă cu CM bilateral, în familia căreia, de asemenea, exista un caz de CM (mama a decedat în urma CM) (figura 6.).

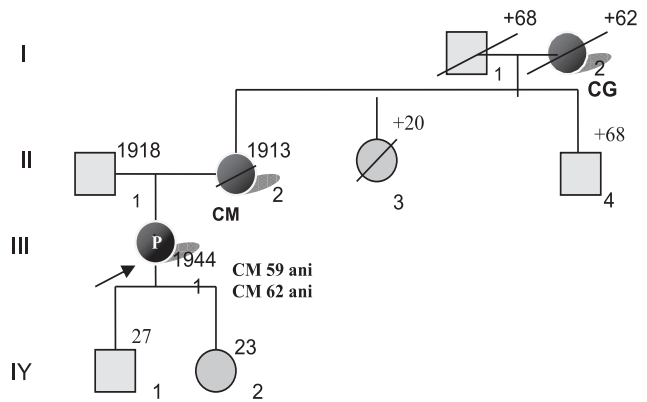


Figura 6. Arborele genealogic al pacientei G., mutația 6174delT în gena BRCA2.

La pacientă (III-1) a fost depistată mutația 6174delT în gena BRCA2, diagnosticul: CM bilateral la vârsta de 59 și 62 ani, la mamă (II-2) a fost depistat CM la vârsta de 62 ani, a decedat la vârsta de 70 ani. Bunica (I-2) a avut cancer gastric.

În acest mod, riscul de dezvoltare a cancerului ovarian primar multiplu și a cancerului mamar se asociază cu portajul genelor BRCA1 sau BRCA2 și poate implica nu doar ovarele și glanda mamară, dar și intestinul gros, stomacul, prostata, pancreasul, melanomul cutanat, glanda tiroidă, și poate să difere printre variantele mutațiilor în limitele genei. Datele din literatura de specialitate au demonstrat, că mutațiile germinale ale genelor BRCA1/2 se asociază cu dezvoltarea altor tumori, inclusiv a CM la bărbați, a cancerului de prostată, pancreas și melanomului.

În plus, la pacientele cu NMPM afectare prin CO și mutații identificate în gena BRCA1, în 55% de cazuri au fost identificate sindroame familiale de cancer. Astfel, inactivarea genei BRCA1, în primul rând, duce la cazuri familiale de aceste afecțiuni, iar frecvența mutațiilor crește concomitent cu creșterea numărului de membri afectați ai familiei. Aceasta semnifică, că manifestarea tumorilor primare multiple cu afectarea glandei mamare și a ovarelor la o pacientă sporește probabilitatea depistării mutațiilor genei BRCA1.

Printre 11 pacienți cu NMPM cu afectarea ovarelor au fost identificate 4 tipuri de mutații ale genei BRCA1: 5382insC (exon 20), 300T>G (exon 5), 185delAG (exon 5) și 4153delA (exon 11). S-a constatat, că mutațiile 5382insC și 300T>G la aceste pacienți se întâlnesc cel mai frecvent. Identificarea diferitor tipuri de mutații ale genei BRCA1 a permis de a urmări particularitățile clinice de manifestare a neoplasmelor în fiecare din familiile pacienților purtătoare ale acestor mutații. În funcție de poziția mutației în genă, riscul de dezvoltare a neoplasmelor era diferit. În cazul tipului de mutație 5382insC

(exon 20), comparativ cu alte variante de mutații ale genei BRCA1, afectarea asociată prin cancer ovarian și a altor regiuni anatomice: ovare+glandă mamară, + glandă tiroidă, + rinichi și + melanom este cea mai frecventă.

În afară de aceasta, în familiile pacientelor purtătoare ale mutației 5382insC, comparativ cu alte tipuri de mutații ale genei BRCA1, rudele sunt afectate de cancerul organelor reproductive feminine, cancer de prostată și de melanom cutanat. Examinarea arborilor genealogici ai pacientelor cu mutații identificate în gena BRCA1 atestă per ansamblu, că în fiecare din familiile analizate se întâlnește un cancer de tip specific, însă rudele pacientelor cu CO și CM sunt afectate cel mai frecvent.

În acest sens, sunt interesante familiile asociate cu mutația 300T>G (exon 5) a genei BRCA1, în care membrii familiilor au fost afectați de cancer cu diferite localizări anatomice, printre care cancerul de intestin gros și gastric se întâlnește mai frecvent, decât în alte tipuri de mutații. Pe când în alte tipuri de mutații, 4153delA (exon 11) și 185delAG (exon 2), rudele mai frecvent sunt afectate de cancerul cu aceeași localizare anatomică și/sau CM. Date similare au fost obținute și în alte studii, în care a fost stabilit că riscul de dezvoltare a cancerului asociat portajului genelor a BRCA1 sau BRCA2 poate să difere printre variantele mutațiilor în limitele genei. Astfel, s-a demonstrat că mutațiile germinale ale genei BRCA1 se asociază cu dezvoltarea afectării primar multiple cu implicarea ovarelor și a glandei mamare. La acești pacienți au fost depistate 4 tipuri de mutații ale genei BRCA1: 5382insC (exon 20), 300T>G (exon 5), 185delAG (exon 5) și 4153delA (exon 11). Mutațiile 5382insC și 300T>G la pacientele cu afectare primar multiplă se întâlneau mai frecvent.

Concluzii.

Reieșind din datele obținute, în familiile purtătoarelor mutației genelor BRCA1 există un risc mai înalt de dezvoltare a neoplasmelor, inclusiv a celor primar multiple cu afectarea tractului gastrointestinal și a or-

ganelor reproductive feminine. Diagnosticul ADN și depistarea acestor mutații la pacienți pot fi utilizate pentru estimarea riscului de dezvoltare a cancerului cu localizările indicate și confirmarea diagnosticului la rudele lor apropiate.

Alte aspecte importante, în ceea ce privește utilizarea determinării susceptibilității pentru cancer în calitate de instrument diagnostic, sunt: vârsta precoce la manifestarea cancerului la pacient sau la un membru al familiei acestuia; prezența în familie a pacienților cu afectarea primar multiplă prin tumori maligne; numărul mare de indivizi afectați în mai mult de o generație de rude; prezența în familie a unui număr mare de afectări multifocale și bilaterale ale organelor pare; prezența în familie a asocierilor specifice tumorale, care pot fi unificate în noțiunea de sindrom; depistarea genei, specific asociate cu apariția neoplasmului, la unul din membrii familiei.

Bibliografie.

1. Акуленко Л. Генетика и рак органов женской репродуктивной системы. В: Мед. газ., 2015, № 35 (11 мая), с. 8-9.
2. Лазарев А.Ф., Петрова В.Д., Терехова С.А. Многофакторный анализ и цифровые технологии при формировании групп высокого онкологического риска. В: X Российский онкологический конгресс. Материалы конгресса. Москва, 2015, с. 49-52.
3. Lynch H.T., Fitzgibbons R. Jr. *Surgery, desmoid tumors, and familial adenomatous polyposis: case report and literature review*. In: Am J. Gastroenterol. 1996, vol. 91, nr. 1, p. 2598-2601.
4. Lynch H.T., Fritchot B.C., Lynch J.F. *Familial atypical multiple mole-melanoma syndrome*. In: J. Med. Genet., 1999, vol. 15, p. 352-356.
5. Lynch H.T., Lynch J.F. *What the physician needs to know about Lynch syndrome*. In: Oncology, 2015, vol. 19, nr. 4, p. 455-463.
6. Lynch H.T., Smyrk T.C. *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome)*. In: Cancer, 1999, vol. 78, p 1149-1167.
7. Lynch H.T., Smyrk T., Lynch J. *An update of HNP-CC (Lynch syndrome)*. In: Cancer Genet Cytogenet, 1998, vol. 93, nr. 1, p. 84-99.