

Эпигенетические и генетические нарушения функций генов *BRCA1/2* у больных солитарным раком яичников и раком яичников при полинеоплазии

М.Э. Эсенова, Ю.Г. Паяниди, С.В. Винокурова, А.С. Шевчук, М.Н. Тихоновская, К.И. Жордания
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Мээрим Эсеновна Эсенова m.esenovna@mail.ru

Введение. Рак яичников (РЯ) – сложное и малоизученное заболевание, уносящее жизни до 70–80 % пациенток. Поэтому практических врачей интересует любая перспектива улучшения выживаемости данной категории больных. С этих позиций изучение генетических и эпигенетических функций, связанных с возникновением этой патологии, нам кажется своевременным и перспективным.

Цель исследования – изучить клинко-морфологические особенности опухолей у больных РЯ с учетом наличия мутаций и метилирования генов *BRCA1/2*.

Материалы и методы. В исследование было включено 180 больных РЯ (FIGO I–IV стадии), получавших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2008 по 2019 г. В соответствии с *BRCA*-статусом и количеством первичных опухолей пациентки были поделены на 3 группы. Объектами исследований явились венозная кровь больных, клинические образцы РЯ (биопсийный материал), а также архивные образцы гистологических препаратов и парафиновые блоки. Образцы ДНК из цельной крови пациенток протестированы на наличие герминальных мутаций *BRCA1* 5382insC, *BRCA1* 4153delA, *BRCA1* 185delAG, *BRCA2* 6174delT методом пиросеквенирования. ДНК из биопсийного материала и архивных парафиновых срезов проанализированы на наличие метилирования в промоторах генов *BRCA1* и *BRCA2* методом бисульфитного пиросеквенирования на приборе Qiaagen Q24 (Qiagen, США) с использованием специфических праймеров, амплифицирующих локусы, содержащие промоторные области генов *BRCA1* и *BRCA2*.

Результаты. Проведенное молекулярно-генетическое тестирование показало, что частота встречаемости мутаций гена *BRCA1* у больных солитарным РЯ составила 21,1 % (38/148), а у больных РЯ при полинеоплазии – 40,6 % (13/32). Частота встречаемости метилирования промотора гена *BRCA1* у больных солитарным РЯ составила 12,2 % (18/148), а в группе больных РЯ при полинеоплазии – 3,1 % (1 наблюдение). В 100 % случаев опухоль яичников при наличии метилирования была представлена серозной аденокарциномой: в 15 (78,9 %) наблюдениях – high grade и в 4 (21,1 %) – low grade.

Выводы. Гиперметилирование промотора *BRCA1* было выявлено только в группе больных спорадическим серозным РЯ. Метилирование не было обнаружено у больных несерозным РЯ, а также у больных РЯ – носительниц мутаций гена *BRCA1* (как при солитарном РЯ, так и при первично-множественном процессе).

Ключевые слова: рак яичников, мутации генов *BRCA1/2*, гиперметилирование промотора *BRCA1/2*

Для цитирования: Эсенова М.Э., Паяниди Ю.Г., Винокурова С.В. и др. Эпигенетические и генетические нарушения функций генов *BRCA1/2* у больных солитарным раком яичников и раком яичников при полинеоплазии. Тазовая хирургия и онкология 2021;11(2):11–8. DOI: 10.17650/2686-9594-2021-11-2-11-18.

Genetic and epigenetic profiling of the *BRCA1/2* genes in solitary ovarian cancer and multiple primary ovarian tumors

M.E. Esenova, Yu.G. Payanidi, S.V. Vinokurova, A.S. Shevchuk, M.N. Tikhonovskaya, K.I. Zhordania

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Contacts: Meerim Esenovna Esenova m.esenovna@mail.ru

Background. Ovarian cancer is a complex and poorly studied disease that kills nearly 70–80 % of patients. Therefore, practitioners are interested in any opportunity of improving survival of these patients. From this point of view, investigation of genetic and epigenetic functions associated with this pathology is quite promising.

Objective: to assess clinical and morphological characteristics of tumors in ovarian cancer patients, considering the presence of mutations and methylation in the *BRCA1/2* gene.

Materials and methods. This study included 180 ovarian cancer patients (FIGO stage I–IV) treated in the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center between 2008 and 2019. Study participants were divided into 3 groups according to their *BRCA* status and the number of primary tumors. We collected and analyzed venous blood, biopsy samples of ovarian cancer, archived histological sections, and paraffin-embedded tissue blocks. DNA isolated from venous blood was used to identify the following germline mutation by pyrosequencing: *BRCA1* 5382insC, *BRCA1* 4153delA, *BRCA1* 185delAG, and *BRCA2* 6174delT. DNA isolated from biopsy specimens and paraffin-embedded tissue specimens was used to analyze methylation in the promoter regions of the *BRCA1* and *BRCA2* genes by bisulfite sequencing (PyroMark Q24 DNA Sequencer; Qiagen, USA) with specific primers targeting promoter regions of the *BRCA1* and *BRCA2* genes.

Results. Molecular testing demonstrated that the frequency of *BRCA1* gene mutations was 21.1 % (38/148) in patients with solitary ovarian cancer and 40.6 % (13/32) in patients with multiple primary ovarian cancers. The frequency of methylation of the *BRCA1* gene promoter was 2.2 % (18/148) in patients with solitary ovarian cancer and 3.1 % (1 case) in patients with multiple primary ovarian cancers. All *BRCA1* methylated ovarian tumors were serous adenocarcinomas, including high grade tumors in 15 patients (78.9 %) and low-grade tumors in 4 patients (21.1 %).

Conclusion. Hypermethylation of the *BRCA1* gene promoter was observed only in individuals with sporadic serous ovarian cancer. No methylation was detected in patients with non-serous ovarian cancer, as well as in patients carrying *BRCA1* gene mutations (both with solitary ovarian cancer and with primary multiple ovarian tumors).

Key words: ovarian cancer, *BRCA1/2* gene mutations, *BRCA1/2* promoter hypermethylation

For citation: Esenova M. E., Payanidi Yu. G., Vinokurova S. V. et al. Genetic and epigenetic profiling of the *BRCA1/2* genes in solitary ovarian cancer and multiple primary ovarian tumors. *Tazovaya Khirurgiya i Onkologiya = Pelvic Surgery and Oncology* 2021;11(2):11–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/2686-9594-2021-11-2-11-18.

Введение

По данным Международного агентства по изучению рака, ежегодно в мире регистрируется более 225 500 новых случаев рака яичников (РЯ) и 140 200 женщин погибает от этого заболевания (IARS). В Российской Федерации за 2018 г. всего было выявлено 14 318 новых случаев РЯ, и 7 616 женщин умерло от данной патологии [1]. Смертность от РЯ занимает 1-е место среди всех гинекологических злокачественных новообразований [2].

Такие неутешительные статистические данные и определили целесообразность разработки мероприятий, которые способствовали бы улучшению ранней диагностики, лечения и профилактики РЯ. В первую очередь это относится к наследственным формам опухолевых и предопухолевых патологий. Большим шагом вперед к реализации этих задач следует считать достижения медицинской генетики, а именно выявление новых генов и их мутаций, которые приводят к появлению целого ряда онкологических заболеваний. Например, выявление мутаций генов *BRCA1* (17q21.31) и *BRCA2* (13q13.1) широко внедрилось в клиническую практику и стало уже рутинным. Основными функциями гена *BRCA1* являются репарация ДНК, транскрипция, регуляция клеточного цикла, убиквитинирование белков. Большинство мутаций вовлекают короткие участки генов с последующей потерей их функции. Ген *BRCA2* кодирует белок, ответственный за репарацию ДНК. Как и в *BRCA1*, мутация в обоих аллелях обуславливает утрату функции репарационного белка

и, как следствие, развитие рака молочной железы (РМЖ) и/или РЯ. Доказано, что 5–15 % случаев РЯ и РМЖ возникают в результате герминальных мутаций этих генов, а синдром семейного РЯ и/или РМЖ составляет примерно 65–85 % всех наследственных форм РЯ [3, 4].

Вместе с тем выяснилось, что герминальные мутации *BRCA1* и *BRCA2* не определяют весь спектр наследственных форм рака органов женской репродуктивной системы. У 20–55 % больных с другими семейными синдромами эти гены не выявляются. Кроме того, встречаются другие канцерогенные аберрации генов *BRCA1/2* (соматические мутации, потеря гетерозиготности и т. п.) при РМЖ и РЯ. Так, одним из механизмов подавления транскрипции генов является метилирование ДНК [5].

Метилирование промоторов различных генов, в том числе генов – супрессоров опухолевого роста, может приводить к полному или частичному подавлению транскрипции гена. Установлено, что при спорадических формах РМЖ и РЯ часто отсутствуют мутации генов *BRCA1/2*, что заставило предположить эпигенетическую природу инактивации этих генов. Было показано наличие метилирования *BRCA1* и *BRCA2* у пациенток со спорадическими формами РМЖ [6–8].

Целью нашего исследования стало изучение клинико-морфологических особенностей опухолей у больных спорадическим РЯ и РЯ при полинеоплазии с учетом метилирования генов *BRCA1/2*.

Материалы и методы

В соответствии с поставленной задачей в исследование было включено 180 больных РЯ (FIGO I–IV стадии), получавших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2008 по 2019 г.

Критерии включения:

- впервые диагностированный, FIGO I–IV стадии, серозный или несерозный РЯ, рак фаллопиевых труб или первичный рак брюшины;
- платиночувствительный рецидив серозного или несерозного РЯ, рака фаллопиевых труб или брюшины;
- статус ECOG 0–1;
- платинорезистентный рецидив РЯ, рака фаллопиевых труб или брюшины при наличии гистологических блоков первичной опухоли.

Критерии исключения:

- больные с полным клиническим ответом на первичное лечение серозного или несерозного РЯ, рака фаллопиевых труб или брюшины, FIGO I–IV стадии, без прогрессирования при отсутствии гистологических блоков первичной опухоли;
- платинорезистентный рецидив РЯ, рака фаллопиевых труб или брюшины при отсутствии гистологических блоков первичной опухоли.

Поскольку метилирование в конечном итоге, подобно мутациям *BRCA1*, приводит к нарушению функции этого гена, нам показалось целесообразным на 1-м этапе выделить группы больных РЯ с мутациями гена *BRCA1* и гиперметилением промотора гена *BRCA1*, а затем сравнить их.

По количеству первичных опухолей мы сразу разделили пациенток на 2 группы: больные солитарным РЯ ($n = 148$) и больные первично-множественными злокачественными новообразованиями (ПМЗН), одно из которых – РЯ ($n = 32$). Поскольку считается, что ПМЗН являются одним из проявлений наследственных синдромов, и, по данным различных авторов, частота встречаемости мутаций генов *BRCA1/2* у больных полинеоплазией значительно выше, чем в популяции, мы выделили эту группу больных как отдельную и сначала определяли частоту встречаемости у них мутаций гена *BRCA1*, а затем – частоту гиперметиления промотора гена *BRCA1*.

Объектами исследований явились клинические образцы РЯ (биопсийный материал), а также архивные образцы гистологических препаратов и парафиновые блоки. Анализ клинических характеристик проводили на основании архивных данных первичной медицинской документации больных РЯ, включенных в исследование. Для определения наследственных мутаций в генах *BRCA1/2* использовали венозную кровь больных РЯ.

Для выделения ДНК из биопсийного материала больных РЯ и клеток из цельной крови использовали набор для выделения и очистки геномной ДНК из цельной крови и другого биологического материала

ExtractDNA Blood («Евроген», VM011). В архиве патоморфологической лаборатории были подобраны гистологические блоки операционного материала пациенток. Из отобранных парафиновых гистологических блоков были сделаны серийные срезы, методом микродиссекции под контролем световой микроскопии выделяли опухолевую ткань. ДНК из опухолевой ткани была выделена при помощи набора для выделений и очистки ДНК из срезов с FFPE-блоков и цитологических стеклопрепаратов (ExtractDNA FFPE, «Евроген»).

Полученные образцы ДНК из цельной крови пациентов протестированы на наличие герминальных мутаций *BRCA1* 5382insC, *BRCA1* 4153delA, *BRCA1* 185delAG, *BRCA2* 6174delT методом пиросеквенирования с использованием набора «BRCA-скрин» («Интерлабсервис»). ДНК из биопсийного материала и архивных парафиновых срезов проанализированы на наличие метилирования в промоторах генов *BRCA1* и *BRCA2* методом бисульфитного пиросеквенирования на приборе PyroMark Q24 (Qiagen, США) с использованием специфических праймеров, амплифицирующих локусы, содержащие промоторные области генов *BRCA1* и *BRCA2*. Полученные в результате секвенирования последовательности анализировали при помощи программного обеспечения PyroMark Q24 Advanced Software, позволяющего проводить анализ уровня метилирования сайтов CpG или CpN. Корреляционный анализ метилирования и экспрессии генов *BRCA1* проанализирован с использованием информации из открытых баз данных TCGA.

Таким образом, в соответствии с *BRCA*-статусом и количеством первичных опухолей были сформированы 3 группы больных РЯ и проанализированы их клиничко-морфологические особенности:

- 1) больные солитарным РЯ (*BRCA*-ассоциированным и *BRCA*-отрицательным);
- 2) больные РЯ при ПМЗН (*BRCA*-ассоциированным и *BRCA*-отрицательным);
- 3) больные РЯ с гиперметилением промотора гена *BRCA1* (солитарный РЯ и РЯ при полинеоплазии).

Материалы исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием методов параметрического и непараметрического анализов. Накопление, систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016. Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 13.3 (StatSoft Inc, США). Статистическую значимость различий между сравниваемыми группами оценивали по непараметрическому двустороннему U-критерию Манна–Уитни. Уровень статистической значимости был принят равным 0,05.

Результаты

Солитарный РЯ. В наше исследование вошло 148 больных солитарным РЯ, средний возраст которых составил $54,3 \pm 10,3$ года.

Проведенное молекулярно-генетическое тестирование показало, что у этих пациенток было обнаружено 38 (21,1 %) случаев мутаций в гене *BRCA1*, из них 2 (5,2 %) случая с мутацией 185delAG, 24 (63,2 %) – с мутацией 5382insC, 1 (2,6 %) – с мутацией 6174delT, 2 (5,2 %) – с мутацией 300T>G, 4 (10,4 %) – с мутацией 4153delA и 5 (13,4 %) случаев – с мутацией 2080delA. Иными словами, у носительниц мутаций гена *BRCA1*, больных солитарным РЯ, чаще всего встречалась мутация 5382insC.

Средний возраст больных РЯ, не являющихся носительницами мутаций, составил $61,2 \pm 10,9$ года, а средний возраст пациенток – носительниц мутаций был достоверно ниже – $52,5 \pm 10,1$ года ($p < 0,05$). Из гистологических форм опухолей у больных солитарным РЯ – носительниц мутаций гена *BRCA1* лишь в 1 (2,6 %) наблюдении имела место эндометриоидная аденокарцинома high grade, в 37 (97,4 %) – серозная аденокарцинома (в 27 (72,9 %) случаях – серозная аденокарцинома high grade и в 10 (27,1 %) случаях – серозная аденокарцинома low grade).

Отдаленные результаты лечения. Общая 3-летняя выживаемость больных, не являющихся носительницами мутаций гена *BRCA1*, составила 63,2 %. Общая 3-летняя выживаемость больных солитарным РЯ – носительниц мутаций гена *BRCA1* составила 83,6 %.

Рак яичников и полинеоплазия. В нашем исследовании полинеоплазия была выявлена у 32 из 180 больных РЯ. В структуре полинеоплазии преобладало сочетание 2 опухолей – в 30 (93,8 %) наблюдениях. Тройная локализация отмечена в 2 (6,2 %) наблюдениях. Четыре и более новообразования не встречались ни разу. При этом метакронно новообразования были выявлены у 30 (93,8 %) больных, синхронно – у 1 (3,1 %) пациентки. В 1 (3,1 %) наблюдении опухоли были сочетанные, т.е. здесь речь идет о тройной комбинации опухолей при полинеоплазии (в данном случае – о синхронно-метакронном типе). Сочетание первичных опухолей эпителиального строения отмечалось в 28 (87,5 %) наблюдениях, а эпителиального и неэпителиального – в 4 (12,5 %).

Локализация первичных опухолей у больных полинеоплазией отображена в таблице. Средний возраст клинического проявления РЯ составил $49,4 \pm 12,1$ года.

Таким образом, РЯ при полинеоплазии чаще всего возникал метакронно (30 (93,8 %) случаев), как вторая первичная опухоль (30 (93,8 %) случаев) и сочетался с заболеванием молочной железы (16 (80 %) случаев).

В группе больных ПМЗН с поражением яичников выявлено 13 (40,6 %) случаев мутаций в гене *BRCA1*, что превышает частоту встречаемости мутаций в группе больных солитарным РЯ (38 (21,1 %) случаев) ($p < 0,05$). При этом мутация 5382insC была выявлена в 10 (76,9 %) случаях, мутация 185delAG – в 1 (7,7 %), мутация 4153delA – в 1 (7,7 %), мутация 2080delA – в 1 (7,7 %) случае. Таким образом, как и при солитарном РЯ, при РЯ и ПМЗН чаще всего выявлялась 5382insC

мутация гена *BRCA1* – 24 (63,2 %) и 10 (76,9 %) наблюдений соответственно.

Выборки больных раком яичников при полинеоплазии
Groups of ovarian cancer patients with polyneoplasia

Диагноз Diagnosis	Число пациенток Number of patients
Первично-множественные злокачественные новообразования с поражением яичников, в том числе: Multiple primary malignant neoplasms with ovarian involvement, including:	32
РЯ + рак молочной железы OC + breast cancer	16
РЯ + рак тела матки OC + uterine cancer	5
РЯ + меланома + РЯ OC + melanoma + OC	1
РЯ + меланома OC + melanoma	1
РЯ + лимфома Ходжкина OC + Hodgkin lymphoma	2
РЯ + рак желудка OC + gastric cancer	1
РЯ + рак сигмовидной кишки OC + sigmoid colon cancer	3
рак прямой кишки + РЯ rectal cancer + OC	1
рак молочной железы + рак шейки матки + РЯ breast cancer + cervical cancer + OC	1
рак шейки матки + РЯ cervical cancer + OC	1

Примечание. РЯ – рак яичников.
Note. OC – ovarian cancer.

У больных РЯ при полинеоплазии мутации гена *BRCA1* были обнаружены у 10 (76,9 %) больных РМЖ и РЯ: мутация 5382insC – в 7 (70 %) наблюдениях, мутация 185delAG – в 1 (10 %), мутация 4153delA – в 1 (10 %), мутация 2080delA – в 1 (10 %) наблюдении. Кроме того, у 3 больных (меланома + РЯ, РЯ + меланома + РЯ, РМЖ + рак шейки матки + РЯ) было обнаружено по 1 мутации 5382insC.

Средний возраст больных РЯ при полинеоплазии, у которых мутации не обнаружены, на момент выявления РЯ составил $57,6 \pm 13,7$ года, а средний возраст больных РЯ при ПМЗН – носительниц мутаций гена *BRCA1* – $43,0 \pm 5,8$ года.

Таким образом, наше исследование показало, что при наличии мутаций гена *BRCA1* средний возраст возникновения РЯ значительно ниже, чем при их отсутствии. Это можно проследить как в группе больных солитарным РЯ, так и в группе больных РЯ при ПМЗН. При этом средний возраст возникновения РЯ у больных – носительниц мутаций гена *BRCA1* при полинеоплазии достоверно ниже, чем средний возраст больных солитарным РЯ – носительниц мутаций, и составляет $43,0 \pm 5,8$ и $52,5 \pm 10,1$ года соответственно ($p < 0,05$).

У больных *BRCA1*-ассоциированным РЯ при ПМЗН из гистологических форм опухоли имела место только серозная аденокарцинома яичников: в 12 (91,7 %) случаях – high grade и в 1 (8,3 %) случае – low grade. У остальных 19 больных РЯ при ПМЗН, у кого не были выявлены мутации, в 13 (68,2 %) случаях имел место серозный РЯ (в 9 случаях – high grade, в 4 случаях – low grade), в 3 (15,9 %) – муцинозный high grade, в 2 (10,6 %) – эндометриоидный high grade и в 1 (5,3 %) случае – светлоклеточный РЯ.

Отдаленные результаты лечения. Актуариальная общая 3-летняя выживаемость больных РЯ при ПМЗН составила 84,2 %.

Анализ метилирования гена *BRCA1*. Проведен анализ метилирования промотора гена *BRCA1* у 32 больных РЯ при ПМЗН и у 148 больных солитарным РЯ. Уровень метилирования 10 % выбран за пограничное значение. Так, средний уровень метилирования всех CpG, входящих в исследуемый район, выше 10 % принимался за положительный уровень метилирования, ниже 10 % – за отрицательный (рис. 1, 2).

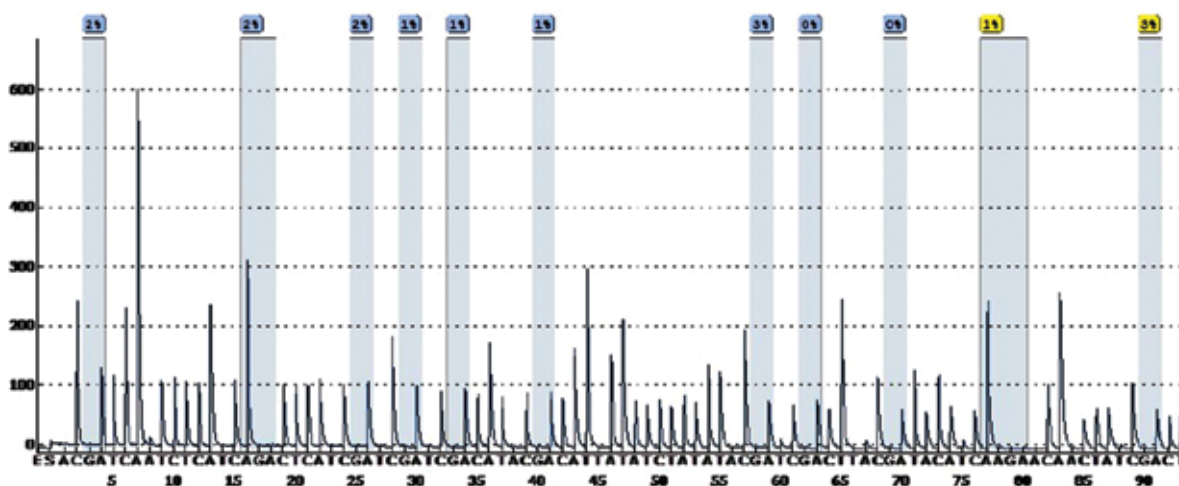
Наличие метилирования гена *BRCA1* у больных ПМЗН было выявлено только в 1 (3,1 %) наблюдении, у больной синхронным серозным РЯ high grade

и раком прямой кишки (аденокарцинома G₂), причем метилирование имело место как в опухоли яичников, так и в опухоли кишки. При этом частота метилирования гена *BRCA1* у больных с солитарным РЯ в нашем исследовании составляет 12,2 % (18 из 148 пациенток). Полученные результаты указывают на то, что инактивация функции гена *BRCA1* у больных ПМЗН связана в основном с генетическими механизмами, так, у 13 (40,6 %) пациенток были выявлены наследственные мутации в гене *BRCA1*.

Среди 148 анализируемых образцов солитарного РЯ 126 составляли первичные серозные аденокарциномы яичника, 16 – первичные несерозные аденокарциномы и 6 – рецидивные карциномы яичника.

Анализ выявил метилирование *BRCA1* у 18 (12,2 %) из 148 больных РЯ. В 16 образцах первичного несерозного РЯ (эндометриодного, муцинозного и светлоклеточного) метилирование гена *BRCA1* не обнаружено, что, скорее всего, связано с небольшим количеством образцов редких гистологических форм РЯ. Также не было обнаружено метилирование в 38 образцах *BRCA1*-ассоциированного солитарного РЯ и РЯ при полинеоплазии.

Well: C1
Assay: BRCA1
Sample ID: TC-198
Note: MF(07.09.19)-
Analysis version: 2.0.7



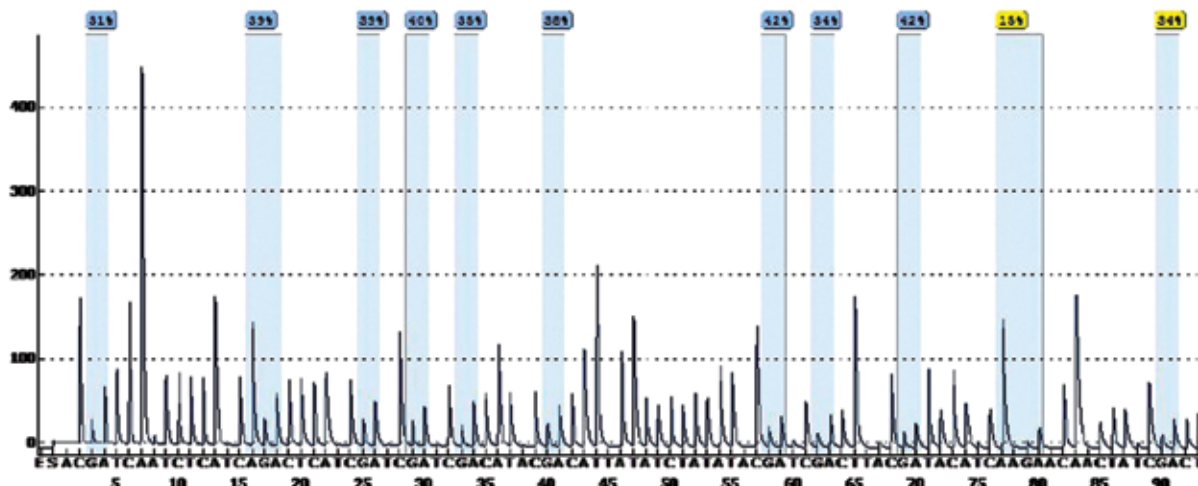
Sequence to analyze:

CCRTCCAAAAATCTCAACRAAACTCACRCCRCRCAATCRCAATTTTAATTTATCTATAATTCRRCRCTTTTCRRTTACCACR
AAAACCAAAAACTACCRCTA

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Quality	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Check	Check
Meth (%)	2	2	2	1	1	1	3	0	0	1	3

Рис. 1. Пример пириграммы анализа метилирования для гена *BRCA1*. Средний уровень метилирования <10 % – неметилированный промотор *BRCA1*
Fig. 1. Example of pyrosequencing results for *BRCA1* gene methylation. Average methylation level <10 % – unmethylated *BRCA1* promoter

Well: C5
 Assay: BRCA1
 Sample ID: TC-209
 Note: MF(07.09.19)-
 Analysis version: 2.0.7



Sequence to analyze:
 CCR TCCAAAAAATCTCAACRAACTCACRCRCRCAATTCRCAATTTTAAATTTATCTATAATTCCCRRCRCTTTTCRRTTACCACR
 AAAACCAAAAAACTACCRCTA

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Quality	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Check	Check
Meth (%)	31	39	39	40	35	38	42	34	42	15	34

Рис. 2. Пример пириграммы анализа метилирования для гена BRCA1. Средний уровень метилирования >10 % – метилированный промотор BRCA1
 Fig. 2. Example of pyrosequencing results for BRCA1 gene methylation. Average methylation level >10 % – methylated BRCA1 promoter

Среди 6 образцов рецидивного РЯ анализ не выявил метилирования BRCA1 (0 %).

Таким образом, из 180 больных РЯ, солитарным и при полинеоплазии, метилирование промотора гена BRCA1 было выявлено в 19 (10,6 %) наблюдениях. Во всех случаях опухоль яичников была представлена серозной аденокарциномой: в 15 (78,9 %) наблюдениях – high grade и в 4 (21,1 %) – low grade. В образцах несерозного РЯ, а также BRCA1-ассоциированного РЯ метилирование выявлено не было.

Отдаленные результаты лечения. Общая 3-летняя выживаемость больных, у которых было обнаружено метилирование промотора гена BRCA1 (n = 19), составила 75,8 %.

Обсуждение

Таким образом, как уже говорилось выше, РЯ считается одной из агрессивных форм онкологических заболеваний, а результаты его ранней диагностики и лечения пока оставляют желать лучшего. Это можно объяснить прежде всего отсутствием эффективных скрининговых программ, позволяющих диагностировать РЯ на начальных стадиях, и, конечно же, нашими скудными познаниями в области его этиопатогенеза

[3, 4, 9, 10]. Однако в настоящее время уже существуют весьма перспективные направления, основанные на молекулярно-генетических технологиях, которые немного приблизили нас к пониманию этой патологии. Наиболее значимым достижением молекулярно-генетических исследований наследственных форм РЯ и РМЖ явилось открытие генов BRCA1/2 (Breast Cancer Associated gene), герминальные мутации которых обуславливают наследственную предрасположенность к этим новообразованиям. Другим механизмом подавления транскрипции генов BRCA1/2 является метилирование их промоторов. Однако особый интерес для клиницистов представляют нарушения функций гена BRCA1 в канцерогенезе яичника ввиду большей распространенности его мутаций по сравнению с BRCA2.

До недавнего времени предполагалось, что гиперметилирование промотора BRCA1 встречается исключительно при спорадических формах РЯ и редко – у пациенток с герминальными мутациями. Вместе с тем этот вопрос детально не изучался, а уровень доказательности отдельных исследований был ограничен. Однако эта парадигма может играть большую роль в клинической практике, в частности, может стать

дополнительным тестом для исключения герминальных мутаций гена *BRCA1* в случае наличия метилирования его промотора. Поэтому основной задачей нашего исследования было выяснить, как часто гиперметилирование промотора встречается у больных sporadическим РЯ, а также у носительниц герминальных мутаций гена *BRCA1*, и тем самым попытаться определить, насколько актуален анализ гиперметилирования промотора *BRCA1* для внедрения в клиническую практику.

Проведенное нами молекулярно-генетическое тестирование больных РЯ, находившихся на лечении в клиниках ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России ($n = 180$), показало, что частота встречаемости мутаций гена *BRCA1* у больных солитарным РЯ составляет 21,1 % (38/148), а у больных РЯ при ПМЗН – 40,6 % (13/32). Частота встречаемости метилирования промотора гена *BRCA1* у больных солитарным РЯ составила 12,2 % (18/148), а в группе больных РЯ при ПМЗН – 3,1 % (1 наблюдение). Метилирование не было обнаружено у больных несерозным РЯ, а также у больных РЯ – носительниц мутаций гена *BRCA1* (как при солитарном, так и при ПМЗН).

Более низкие уровни метилирования промотора, которые обычно имеют место при *BRCA*-ассоциированном раке, вероятно, можно объяснить общей нестабильностью генома, которую проявляют все *BRCA*-ассоциированные опухоли из-за функциональной потери *BRCA1* или *BRCA2* [11–13]. Гаплонедостаточность *BRCA* снижает способность ДНК к репарации и увеличивает нестабильность генома. Таким образом, можно отметить, что *BRCA1/2*-ассоциированный канцерогенез в основном обусловлен мутациями, в то время как метилирование генов-супрессоров играет вторичную роль или появляется как побочный эффект [13, 14]. Мы можем предположить, что, возможно, метилирование промотора *BRCA* стимулирует канцерогенез в субпопуляции носительниц генов *BRCA1/2* [15, 16].

Более высокая частота встречаемости мутаций гена *BRCA1* у больных РЯ при ПМЗН по сравнению с солитарным РЯ, а также низкая частота метилирования (3,1 %) указывают на то, что инактивация функции генов *BRCA* у пациенток с ПМЗН связана в основном с генетическими механизмами.

Биоинформатический анализ данных высокопроизводительного секвенирования позволил выявить новые геномные локусы в гене *BRCA1*, метилирование которых потенциально может быть использовано как прогностические маркеры.

Анализ открытых баз данных и сервисов, содержащих результаты метиломных исследований образцов неопухолевой ткани яичников и РЯ из выборки TCGA, показал статистически значимую зависимость между высоким уровнем метилирования CpG динуклеотидов в промоторе гена *BRCA1* и его сниженной экспрессией.

Заключение

Подобные исследования очень перспективны и имеют большое значение для клинической практики. Сначала определение метилирования промотора *BRCA* было предложено в качестве экономически выгодного предварительного скрининга, который позволил бы исключить наличие герминальных мутаций генов *BRCA1/2*, поскольку сам анализ метилирования с финансовой точки зрения более рентабелен, чем выявление мутаций [16]. Однако следует понимать, что наличие метилирования *BRCA* полностью не исключает наличия мутаций этих генов, т. е. нельзя ожидать от диагностики 100 % чувствительности, так как у некоторых носительниц мутаций генов *BRCA1/2* РЯ или РМЖ способны развиваться sporadически. Вполне возможно, в таких опухолях будет определяться метилирование.

Однако необходимы дальнейшие исследования, чтобы уточнить, какие именно сайты CpG являются оптимальными для выявления sporadических и *BRCA*-ассоциированных опухолей и какие сайты CpG лучше всего прогнозируют ответ на лечение.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2020. Доступно по: https://glavonco.ru/cancer_register/%D0%9F%D0%BE%D0%BC%D0%BE%D1%89%D1%8C%202019.pdf. [Situation with cancer care in Russia in 2019. Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, A.O. Shakhzadova. Moscow: P.A. Herzen Moscow Oncology Research Institute – a branch of the National Medical Research Center of Radiology, Ministry of Health of Russia, 2020. Available at: https://glavonco.ru/cancer_register/%D0%9F%D0%BE%D0%BC%D0%BE%D1%89%D1%8C%202019.pdf. (In Russ.)].
2. Состояние онкологической помощи населению России в 2014 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2015. Доступно по: <http://www.oncology.ru/service/statistics/> condition/2015.pdf. [Situation with cancer care in Russia in 2014. Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, A.O. Shakhzadova. Moscow: P.A. Herzen Moscow Oncology Research Institute – a branch of the National Medical Research Center of Radiology, Ministry of Health of Russia, 2015. Available at: <http://www.oncology.ru/service/statistics/condition/2015.pdf>. (In Russ.)].
3. Филиппова М.Г., Шендрикова Т.А., Портной С.М., Жордания К.И. Мутации генов *BRCA1/2* в ранней диагностике рака яичников у больных

- с синдромом семейного рака молочной железы/рака яичников. Клиническое наблюдение. Онкогинекология 2020;(3):63, 64. Доступно по: https://osors.ru/oncogynecology/JurText/j2020_3/03_20_63.pdf. [Filippova M.G., Shendrikova T.A., Portnoy S.M., Zhordania K.I. *BRCA1/2* gene mutations in early diagnosis of ovarian cancer in patients with family breast/ovarian cancer syndrome. A clinical case study. *Onkoginekologiya = Gynecologic Oncology* 2020;(3):63, 64. Available at: https://osors.ru/oncogynecology/JurText/j2020_3/03_20_63.pdf. (In Russ.)].
4. Жордания К.И., Паяниди Ю.Г., Савостикова М.В. и др. Некоторые нюансы патогенеза рака яичников. Онкогинекология 2016;(1):36–46. Доступно по: https://osors.ru/oncogynecology/JurText/j2016_1/01_16_36.pdf. [Zhordania K.I., Payanidi Yu.G., Savostikova M.V. et al. Some peculiarities of ovarian cancer pathogenesis. *Onkoginekologiya = Gynecologic Oncology* 2016;(1):36–46. Available at: https://osors.ru/oncogynecology/JurText/j2016_1/01_16_36.pdf. (In Russ.)].
 5. Lande-Diner L., Zhang J., Ben-Porath I. et al. Role of DNA methylation in stable gene repression. *J Biol Chem* 2007;282:12194–200.
 6. Brianese R.C., Nakamura K.D.M., Almeida F. et al. *BRCA1* deficiency is a recurrent event in early-onset triple-negative breast cancer: a comprehensive analysis of germline mutations and somatic promoter methylation. *Breast Cancer Res Treat* 2018;167:803–14. DOI: 10.1007/s10549-017-4552-6.
 7. Cai F., Ge I., Wang M. et al. Pyrosequencing analysis of *BRCA1* methylation level in breast cancer cells. *Tumour Biol* 2014;35(4):3839–44. DOI: 10.1007/s13277-013-1508-2.
 8. Li L., Zhang Y., Li N. et al. Nidogen-1: a candidate biomarker for ovarian serous cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2015;45(2):176–82.
 9. Жордания К.И., Паяниди Ю.Г., Гокадзе Н.Н., Калинин Е.В. Рак яичников, мутации *BRCA* и ингибиторы PARP. Онкогинекология 2017;(1):38, 39. Доступно по: https://osors.ru/oncogynecology/JurText/j2017_1/01_17_37.pdf. [Zhordania K.I., Payanidi Yu.G., Gokadze N.N., Kalinicheva E.V. Ovarian cancer, *BRCA* mutations and PARP inhibitors. *Onkoginekologiya = Gynecologic Oncology* 2017;(1):38, 39. Available at: https://osors.ru/oncogynecology/JurText/j2017_1/01_17_37.pdf. (In Russ.)].
 10. Анискина А.С., Паяниди Ю.Г., Артамонова Е.В. и др. Синхронные эндометриоидные аденокарциномы яичников и тела матки: клиническая картина, диагностика, лечение, прогноз (обзор литературы). Онкогинекология 2021;(1):38–49. [Aniskina A.S., Payanidi Yu.G., Artamonova E.V. et al. Synchronous endometrioid adenocarcinomas of the ovaries and the body of the uterus: clinical picture, diagnosis, treatment, prognosis (literature review). *Onkoginekologiya = Gynecologic Oncology* 2021;(1):38–49. (In Russ.)].
 11. Sedic M., Skibinski A., Brown N. et al. Haploinsufficiency for *BRCA1* leads to cell-type-specific genomic instability and premature senescence. *Nat Commun* 2015;6:7505. DOI: 10.1038/ncomms8505.
 12. Václav T., Gymez-Lopez G., Setiqn F. et al. DNA repair capacity is impaired in healthy *BRCA1* heterozygous mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat* 2015;152:271–82. DOI: 10.1007/s10549-015-3459-3.
 13. Паяниди Ю.Г., Абрамов П.М., Гокадзе Н.Н. и др. Роль генетических и эпигенетических нарушений функций гена *BRCA1* при раке яичников и раке молочной железы. Онкогинекология 2020;(1):44, 45. [Payanidi Yu.G., Abramov P.M., Gokadze N.N. et al. The role of genetic and epigenetic disorders of *BRCA1* gene functioning in ovarian and breast cancers. *Onkoginekologiya = Gynecologic Oncology* 2020;(1):44, 45. (In Russ.)].
 14. Suijkerbuijk K.P.M., Fackler M.J., Sukumar S. et al. Methylation is less abundant in *BRCA1*-associated compared with sporadic breast cancer. *Ann Oncol* 2008;19:1870–4. DOI: 10.1093/annonc/mdn409.
 15. Tung N., Miron A., Schnitt S.J. et al. Prevalence and predictors of loss of wild type *BRCA1* in estrogen receptor positive and negative *BRCA1*-associated breast cancers. *Breast Cancer Res* 2010;12(6):R95. DOI: 10.1186/bcr2776.
 16. Dworkin A.M., Spearman A.D., Tseng S.Y. et al. Methylation not a frequent “second hit” in tumors with germline *BRCA* mutations. *Fam Cancer* 2009;8:339–46. DOI: 10.1007/s10689-009-9240-1.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interests.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia. The study was retrospective. All patients gave written informed consent to participate in the study.