

Частота одиннадцати мутаций генов BRCA1 и BRCA2 в неотобранной выборке больных раком молочной железы россиянок

Батенева Е.И., Закрытое акционерное общество «Научно-производственная фирма ДНК-Технология», г. Москва; Мещеряков А.А., к.м.н., Учреждение Российской академии медицинских наук Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, г. Москва; Л.Н.Любченко, д.б.н., Учреждение Российской академии медицинских наук Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, г. Москва; Кадочникова В.В., к.б.н., Закрытое акционерное общество «Научно-производственная фирма ДНК-Технология», г. Москва; Панищева Л.А., Закрытое акционерное общество «Научно-производственная фирма ДНК-Технология», г. Москва; Трофимов Д.Ю., д.б.н., Закрытое акционерное общество «Научно-производственная фирма ДНК-Технология», г. Москва; Ребриков Д.В., д.б.н., Закрытое акционерное общество «Научно-производственная фирма ДНК-Технология», г. Москва

Frequencies of eleven BRCA1 and BRCA2 mutations in random sample of russian breast cancer patients

Bateneva E.I., Meshcheryakov A.A., Lyubchenko L.N., Kadochnikova V.V., Panischeva L.A., Trofimov D.Yu., Rebrikov D.V.

Резюме

Целью работы было установление частот встречаемости одиннадцати ранее описанных мутаций в генах BRCA1 (185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, Cys61Gly, 2080delA, 2963del10) и BRCA2 (6174delT, 1528delAAAA, 9318delAAAA) в неотобранной выборке больных раком молочной железы в Российской популяции (1091 человек). Мутации были найдены у 64 человек (5,87%), преобладала мутация 5382insC (BRCA1) – 4,03% от выборки. Мутации 2963del10 (BRCA1), 1528delAAAA (BRCA2) и 9318delAAAA (BRCA2) не были обнаружены. В результате исследования выявлено 11 пациенток с мутацией в BRCA1 или BRCA2 без каких-либо данных в анамнезе, позволяющих предположить наследственную форму рака молочной железы. Учитывая размер тестированной неотобранной выборки, широту диагностической панели и нахождение зарегистрированных нами мутаций другими авторами, анализ на мутации в генах BRCA1 (185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 300T>G (Cys61Gly), 2080delA) и BRCA2 (6174delT) может быть рекомендован для включения в скрининговые программы по выявлению наследственных случаев рака молочной железы. **Ключевые слова:** мутация, BRCA1; BRCA2; рак молочной железы; российская популяция

Summary

In this study we were aiming to determine frequencies of eleven known mutations in BRCA1 (185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, Cys61Gly, 2080delA, 2963del10) and BRCA2 (6174delT, 1528delAAAA, 9318delAAAA) in random sample of patients with breast cancer, Russian population (1091 cases). We found 64 mutation carriers (5,87%), primarily with 5382insC (BRCA1) mutation – 4,03% from the sample. We did not detect three mutations: 2963del10 (BRCA1), 1528delAAAA (BRCA2) and 9318delAAAA (BRCA2). We revealed 11 mutation carriers among patients without any anamnesis data supposing hereditary form of breast cancer. Taking into account the range of analyzed random sample and diagnostic panel and detection of listed below mutations in other Russian studies, we assume mutations in BRCA1 (185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 300T>G (Cys61Gly), 2080delA) and BRCA2 (6174delT) tests could be recommended for inclusion in screening programs for revelation of hereditary breast cancer cases.

Key words: mutation, BRCA1; BRCA2; breast cancer; Russians

Ответственный за ведение переписки -
Батенева Елена Ильинична,
117587 Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, к.б, 11 этаж,
тел.: +7 (495) 980-45-55
e-mail: bateneva@dna-technology.ru

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) – это наиболее частая форма рака среди женщин в экономически развитых странах, поражающая в течение жизни примерно каждую десятую женщину. В России ежегодно регистриру-

ются свыше 50000 новых случаев РМЖ. Прирост заболеваемости РМЖ за 5 лет (с 2002 по 2007 годы) составил 13,1%. Рак молочной железы занимает у женщин первое место как в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями (20,0%), так и в структуре смертности от них (17,3%). В течение последних десятилетий добиться уменьшения смертности от рака молочной железы в России не удастся: более 50% пациенток с установленным диагнозом погибает [1].

Для снижения смертности от рака молочной железы необходима ранняя диагностика заболевания. Чем позже ставится диагноз, тем выше стоимость лечения и ниже его эффективность. В то же время на диагностику в Российской Федерации тратится лишь 5% средств, на лечение – 95%!

Снижение стоимости лечения при ранней диагностике рака молочной железы происходит за счет уменьшения:

- длительности госпитализации;
- объема операции;
- частоты инвалидизации пациенток;
- времени нетрудоспособности;
- необходимости реконструктивных операций;
- необходимости назначения дорогостоящего послеоперационного лекарственного лечения и т.д.

Профилактика и раннее выявление рака молочной железы особенно важны в группах риска. Самым существенным фактором риска остается генетическая предрасположенность. От 5 до 10% случаев РМЖ являются наследственными [2]. Считается, что 30-50% [3] из них обусловлены мутациями в генах BRCA1 (MIM 113705) [4] и BRCA2 (MIM 600185) [5]. Гены BRCA1 и BRCA2 локализованы на 17-й и 13-й хромосомах, соответственно, и кодируют белки, участвующие в процессах репарации ДНК. Мутации в обоих генах значительно увеличивают индивидуальный риск рака молочной железы и рака яичников (РЯ). Средние кумулятивные риски для носителей мутаций в гене BRCA1 к возрасту 70 лет составляют 57-65% (РМЖ) и 39-40% (РЯ); для носителей мутаций в гене BRCA2 – 45-49% (РМЖ) и 11-18% (РЯ) [6, 7]. Приотягощенном семейном анамнезе (множественные случаи рака) риски возрастают: для носителей мутаций в гене BRCA1 до 87% (РМЖ) и 44% (РЯ) [8]; для носителей мутаций в гене BRCA2 – 84% (РМЖ) и 27% (РЯ) [9].

Спектр наследственных мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 достаточно широк, но во многих популяциях наблюдается так называемый эффект основателя, – преобладание нескольких мутаций, специфичных именно для этой этнической группы [3]. Примером популяции с сильным эффектом основателя являются евреи Ашкенази, у которых подавляющее большинство мутаций в генах BRCA составляют три позиции: 185delAG (BRCA1), 5382insC (BRCA1) и 6174delT (BRCA2) [10]. Определение спектра мутаций, характерных для популяции, является важным шагом к созданию недорогих скрининговых тестов для обследования больных РМЖ и здоровых женщин, находящихся в группе высокого риска (отягощенный семейный анамнез).

Материал и методы

Материал для исследований

Исследована неотобранная выборка пациенток (1091 человек), наблюдающихся в РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, г. Москва, с гистологически подтвержденным диагнозом РМЖ. Материалом служили образцы периферической крови, собранные с соблюдением процедуры «информированного согласия». Экстракцию ДНК из 1 мл периферической крови проводили с помощью комплекта реагентов «Проба-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) согласно инструкции производителя.

Генотипирование

Мутации в генах BRCA1 (185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 300T>G (Cys61Gly), 2080delA, 2963del10) и BRCA2 (6174delT, 1528delAAAA, 9318delAAAA) определяли при помощи набора реагентов «ОнкоГенетика BRCA» (расширенная комплектация) (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) согласно инструкции производителя. Работа тест-систем основана на модифицированном методе «примыкающих проб» (kissing probes) [11]. Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием детектирующего амплификатора ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Анализ кривых плавления проводили при помощи программного обеспечения к детектирующему амплификатору ДТпрайм (см. таблицу 1).

Результаты и обсуждение

Была обследована 1091 женщина с гистологически подтвержденным диагнозом рака молочной железы на наличие 11 мутаций в генах BRCA1 (185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 300T>G (Cys61Gly), 2080delA, 2963del10) и BRCA2 (6174delT, 1528delAAAA, 9318delAAAA). Всего было обнаружено 64 случая наличия мутации (5,87% от выборки, см. таблицу 2).

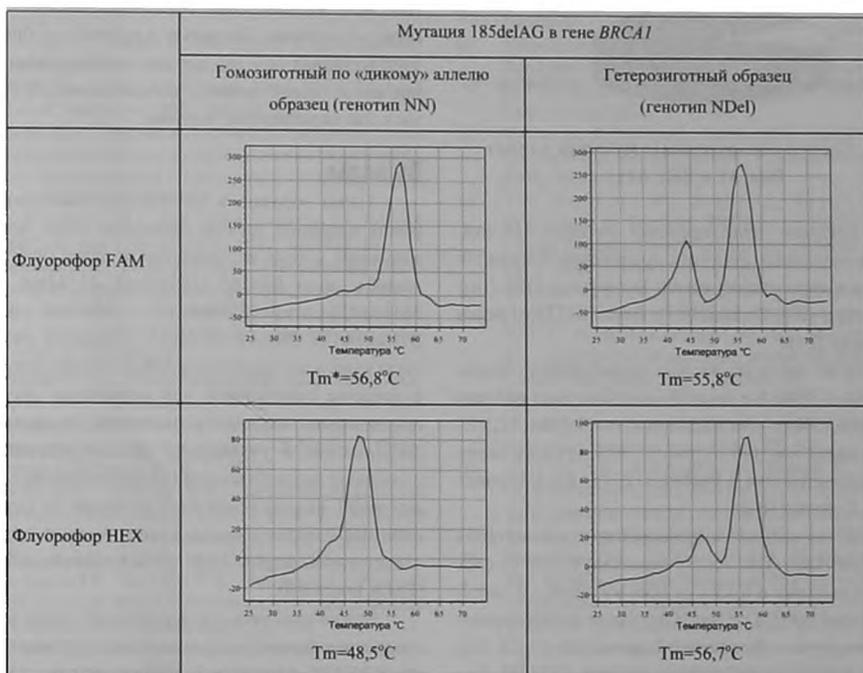
Спектр мутаций и их распределение показаны на рисунке 1.

Мутации в генах BRCA1 и BRCA2 были обнаружены у 5,87% больных РМЖ из неотобранной выборки (64 человека из 1091). Учитывая, что наследственные формы составляют от 5 до 10% случаев РМЖ [2], можно предположить, что зарегистрированные нами мутации объясняют не менее 50% случаев наследственного рака молочной железы в исследованной выборке.

При медико-генетическом консультировании 53 пациенток с выявленной мутацией у 53% из них отмечался семейный рак молочной железы. Случаи других опухолей в анамнезе (не РМЖ, не РЯ) составили 25%. Двухсторонний рак молочной железы отмечен у 25%, сочетание РМЖ и рака яичников отмечено у 2% пациенток. Семейный анамнез не был отягощен у 23% пробандов.

Подавляющую часть обнаруженных в обследованной группе мутаций составляет 5382insC в гене BRCA1. Она была найдена у 44 человек (4,03% от всех пациентов и 68,75% от пациентов с выявленной мутацией, см. таб. 2, рис.1). Это согласуется с данными многочисленных работ отечественных и зарубежных авторов, в кото-

Таблица 1. Кривые плавления, типичные для генотипирования методом «примыкающих проб»



*Примечание. Показаны кривые, полученные при анализе двух образцов (гомозиготного по «дикому» аллелю и гетерозиготного) на наличие мутации 185delAG в гене *BRCA1*.*

**Tm (melting temperature) – температура плавления.*

Таблица 2. Результаты генотипирования неотобранной выборки больных РМЖ (1091 чел.)

Ген	Тривиальное название мутации и rs-номер	Число пациентов с мутацией	Частота в выборке (%)
<i>BRCA1</i>	185delAG (rs80357713)	1	0,09
	4153delA (rs80357711)	8	0,73
	5382insC (rs80357906)	44	4,03
	3819delGTAAA (rs80357609)	2	0,18
	3875delGTCT (rs80357868)	1	0,09
	2963del10 (rs не определен)	0	0
	300T>G (Cys61Gly) (rs28897672)	4	0,37
	2080delA (rs80357522)	2	0,18
<i>BRCA2</i>	6174delT (rs80359550)	2	0,18
	1528delAAAA (rs не определен)	0	0
	9318delAAAA (rs не определен)	0	0

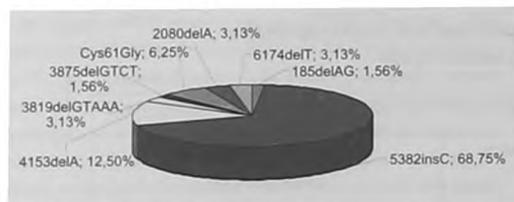


Рис. 1. Спектр обнаруженных мутаций в генах BRCA1 и BRCA2

рых было показано превалирование мутации 5382insC (BRCA1) в различных регионах Российской Федерации [12-17] и ряде европейских стран: Белоруссии [18], Литве [19], Латвии [20], Польше [21], Венгрии [22], Греции [23], Германии [24].

На втором месте по частоте встречаемости оказалась мутация 4153delA в гене BRCA1. Она была найдена у 8 человек (0,73% от всех пациентов в выборке и 12,50% от всех мутаций, см. таб. 2, рис.1). Эта мутация также широко распространена в России [12, 25, 26] и странах Восточной Европы [18-21].

Третьей по частоте встречаемости стала мутация 300T>G (Cys61Gly) (BRCA1) (4 человека, 0,37% от всех пациентов в выборке и 6,25% от всех мутаций, см. таб.2, рис.1). Мутация 300T>G (Cys61Gly) также распространена во многих странах Восточной Европы [18, 19, 21, 22], была ранее найдена в российских работах [17, 26]. Все три перечисленные выше мутации в гене BRCA1 относятся к часто повторяющимся и встречаются во многих странах со славянским населением.

Мутации в гене BRCA1 3819delGTAAA, 3875delGTCT и 2080delA распространены не так широко, однако найдены ранее в России более чем в одном исследовании [13, 17, 25, 27]. Нами они были обнаружены с частотой 0,18%, 0,09% и 0,18% в обследованной выборке, соответственно.

Мутации, типичные для евреев Ашкенази – 185delAG (BRCA1) и 6174delT (BRCA2), обнаружены в одном (0,09%) и двух случаях (0,18%), соответственно. Они также были ранее зарегистрированы в исследовании групп пациентов из разных регионов Российской Фе-

дерации [14, 17, 26].

Мутации 2963del10 (BRCA1), 1528delAAAA (BRCA2), 9318delAAAA (BRCA2) в обследованной выборке не найдены. Поскольку в работах, сообщающих об этих мутациях [13, 16], случаи их обнаружения единичны, можно предположить, что они являются уникальными и для скрининга не значимы.

Выводы

Таким образом, в неотобранной выборке больных раком молочной железы пациенток (1091 человек) обнаружены восемь из одиннадцати ранее описанных мутаций в генах BRCA1 (185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 300T>G (Cys61Gly), 2080delA) и BRCA2 (6174delT). Данную диагностическую панель мутаций генов BRCA можно рекомендовать в качестве стандартной для первичного молекулярно-генетического скрининга пациентов, направленных на обследование в учреждения здравоохранения с целью выявления наследственной предрасположенности к раку молочной железы и/или раку яичников (у здоровых пациентов) и подтверждению генетического диагноза наследственной формы злокачественного новообразования (PMЖ и/или РЯ).

Важно отметить, что в результате проведенного исследования выявлено 11 пациенток с мутацией в BRCA1 или BRCA2 без каких-либо медико-генетических данных, позволяющих предположить наследственную форму рака молочной железы. Этот результат указывает на целесообразность проведения широкого спектра скрининговых исследований. Использование ПЦР «в реальном времени» и, в частности, модифицированного метода «примыкающих проб», позволяет осуществлять массовое, высокопропускное и дешевое генотипирование с применением стандартного, зарегистрированного в МЗСР РФ оборудования и реагентов отечественного производства.

Внедрение подобной тест-системы позволит идентифицировать большинство случаев наследственных форм у больных раком молочной железы, а при обнаружении мутаций у здоровых женщин, направить усилия на профилактику и раннюю диагностику заболевания. ■

Литература:

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2007 году. Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, том 20, 43(77), прил.1 июль-сентябрь 2009г.
2. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы. Практическая Онкология 2010; 11(4): 258-66.
3. Ferla R., Calr V., Cascio S. et al. Founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes. Ann Oncol 2007; 18 (Suppl 6): 93-8.
4. Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D. et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science 1994; 266: 66-71.
5. Wooster R., Bignell G., Lancaster J. et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature 1995; 378:789-92.
6. Antoniou A., Pharoah P.D., Narod S. et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. Am J Hum Genet 2003; 72:1117-30.
7. Chen S., Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. J Clin Oncol 2007; 25:1329-33.
8. Ford D., Easton D.F., Bishop D.T., Narod S.A., Goldgar D.E. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. Lancet 1994; 343:692-5.

9. Ford D., Easton D.F., Stratton M. et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1998; 62:676-89.
10. Struwing J.P., Hartge P., Wacholder S. et al. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *New England Journal of Medicine* 1997; 336:1401-8.
11. Кофиади И.А., Ребриков Д.В. Методы детекции однонуклеотидных полиморфизмов: аллель-специфичная ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой. *Генетика* 2006; 42(1):22-32.
12. Szabo C.I., King M.C. Population genetics of BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 1997; 60:1013-20.
13. Грудниина Н.А., Голубков В.И., Тихомирова О.С. и соавт. Преобладание широко распространенных мутаций в гене BRCA1 у больных семейными формами рака молочной железы Санкт-Петербурга. *Генетика* 2005; 41(3): 405-10.
14. Часовникова О.Б., Митрофанов Д.В., Демченко Д.О., Сидоров С.В., Францкевич О.З., Коваленко С.П. BRCA1 и BRCA2 мутации у больных раком молочной железы в сибирском регионе. *Сибирский Онкологический Журнал* 2010; 5: 32-5.
15. Loginova A.N., Pospekhova N.I., Lyubchenko L.N. et al. Spectrum of mutations in BRCA1 gene in hereditary forms of breast and ovarian cancer in Russian families. *Bull Exp Biol Med* 2003; 136:276-8.
16. Tereschchenko I.V., Basham V.M., Ponder B.A., Pharoah P.D. BRCA1 and BRCA2 mutations in Russian familial breast cancer. *Hum Mutat* 2002; 19: 184.
17. Любченко Л.Н. Наследственный рак молочной железы и/или яичников: ДНК-диагностика, индивидуальный прогноз, лечение и профилактика [диссертация]. Москва 2009: РОНЦ им.Н.Н.Блохина (ПМН).
18. Uglanitsa N., Oszurek O., Uglanitsa K. et al. The contribution of founder mutations in BRCA1 to breast cancer in Belarus. *Clin Genet* 2010; 78:377-80.
19. Elsakov P., Kurtinaitis J., Petraitis S. et al. The contribution of founder mutations in BRCA1 to breast and ovarian cancer in Lithuania. *Clin Genet* 2010; 78:373-6.
20. Tikhomirova L., Sinicka O., Smite D., Eglitis J., Hodgson S.V., Stengrevics A. High prevalence of two BRCA1 mutations, 4154delA and 5382insC, in Latvia. *Fam Cancer* 2005; 4: 77-84.
21. Gyrski B., Cybulski C., Huzarski T. et al. Breast cancer predisposing alleles in Poland. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 92:19-24.
22. Van Der Looij M., Szabo C., Besznyak I. et al. Prevalence of founder BRCA1 and BRCA2 mutations among breast and ovarian cancer patients in Hungary. *Int J Cancer* 2000; 86: 737-40.
23. Konstantopoulou I., Rampias T., Ladopoulou A. et al. Greek BRCA1 and BRCA2 mutation spectrum: two BRCA1 mutations account for half the carriers found among high-risk breast/ovarian cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 107:431-41.
24. Backe J., Hofferbert S., Skawran B. et al. Frequency of BRCA1 mutation 5382insC in German breast cancer patients. *Gynecol Oncol* 1999; 72: 402-6.
25. Gayther S.A., Harrington P., Russell P., Kharkevich G., Garkavtseva R.F., Ponder B.A. Frequently occurring germ-line mutations of the BRCA1 gene in ovarian cancer families from Russia. *Am J Hum Genet* 1997; 60:1239-42.
26. Федорова О.Е., Любченко Л.Н., Паянни Ю.Г. и соавт. Использование биочипов при изучении распространенных мутаций в генах BRCA1/2 и CHEK2 у больных органоспецифическим раком яичников и первично-множественными злокачественными новообразованиями с поражением яичников (российская популяция). *Молекулярная биология* 2007; 41: 37-42.
27. Iyevleva A.G., Suspitsin E.N., Kroeze K. et al. Non-founder BRCA1 mutations in Russian breast cancer patients. *Cancer Lett* 2010; 298: 258-63