

© Т.В. Крук, О.П. Пересунько, Р.А. Волков, 2013

УДК 618.19 – 006.-071-084

<sup>1</sup>Т.В. КРУК, <sup>2</sup>О.П. ПЕРЕСУНЬКО, <sup>1</sup>Р.А. ВОЛКОВ<sup>1</sup>Буковинський державний медичний університет, кафедра онкології та радіології, Чернівці<sup>2</sup>Чернівецький національний університет ім. Ю. Федьковича, кафедра онкології та радіології, Чернівці**КЛІНІКО-ГЕНЕАЛОГІЧНІ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ХВОРИХ НА РАК ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ – ОСНОВА ПРОФІЛАКТИКИ ТА РАННЬОЇ ДІАГНОСТИКИ РАКУ**

Проведено аналіз клініко-генеалогічного анамнезу та частоту виявлення мутацій в гені BRCA1 у хворих на рак грудної залози та їх родичів у Чернівецькій області України. Проведені дослідження підтверджують необхідність спеціального медико-генетичного обстеження сімей з наявністю в родовах хворих на рак різних локалізацій (рак тіла матки, рак яєчників, шлунка, шкіри) з метою покращення ранньої діагностики та профілактики раку.

**Ключові слова:** рак грудної залози, клініко-генеалогічний анамнез, мутації гена BRCA1

**Вступ.** Початок XXI століття характеризується значним збільшенням кількості жінок, хворих на рак грудної залози (РГЗ). Захворюваність на рак грудної залози за останні 15 років зросла на 50 %. За даними ВООЗ, в усьому світі від РГЗ помирає більше 600 000 жінок, а щорічно реєструється більше 1 млн. нових випадків. Так, в Україні кількість захворювань РГЗ в абсолютних цифрах виросла з 1417 (1996 р.), до 1604 (2006 р.), з 54,1 до 63,7 на 100000 випадків відповідно. Кожні 35 хв. в Україні виявляють новий випадок РГЗ, а кожен рік від цієї патології помирає одна жінка [10].

Останні роки позначені стрімким розвитком генетики раку грудної залози. Одним із методів встановлення ролі спадкових факторів у розвитку новоутворень є клініко-генеалогічний метод. Слід зазначити, що причини сімейної агрегації злоякісних пухлин різного генезу можуть бути як генетичними (спадкова передача мутантного гена із покоління у покоління), так і не генетичними (шкідливі умови праці, вплив канцерогенних факторів різної природи на членів сім'ї). Враховуючи це, клініко-генеалогічний аналіз – необхідна ланка для визначення родин з агрегацією новоутворень, характеру і причин їх асоціацій. Такі дослідження дадуть можливість формувати групи ризику, проводити селективний скринінг, визначити долю ризику виникнення онкологічної патології, здійснювати індивідуальний підхід на етапі доклінічної діагностики та профілактики раку [2].

У 1990–1995 роках були виявлені мутації різних генів, що мають пряме відношення до виникнення раку молочної залози. Це ген-супресор *BRCA1*, що локалізується на довгому плечі хромосоми 17, і ген-супресор – *BRCA2*, що локалізується на довгому плечі хромосоми 13, в нормі контролюючі клітинний поділ тканини молочної залози [6, 7, 9]. Сьогодні в усіх провідних молекулярно-генетичних лабораторіях світу проводяться інтенсивні дослідження, спрямовані на вивчення ролі цих мутацій в етіології і патогенезі спадкових форм раку жіночої репродуктивної системи.

Таким чином, останні досягнення генетики істотно розширили уявлення про етіологію і патогенез раку молочної залози, але істинна роль відкритих генів залишається поки незрозумілою.

**Мета дослідження.** На основі проведення клініко-генеалогічного анамнезу дослідити наявність мутацій в гені BRCA1 у хворих на рак молочної залози в Чернівецькій області України.

**Матеріал та методи.** Матеріалом дослідження були дані про хворих жінок на РГЗ, які знаходилися на лікуванні в Чернівецькому обласному онкологічному диспансері протягом 2008–2012 років.

Всі вони були прооперовані, діагноз верифікований морфологічно клініко-генеалогічний аналіз був проведений на основі співставлення родоводів пробандів. При зборі анамнезу отримані дані про наявність або відсутність онкологічної патології у родичів I і II ступеня спорідненості.

Частоту виявлення пухлин в сім'ях пробанда розраховували як співвідношення числа тих, котрі захворіли, до загального числа родичів I і II ступеня спорідненості.

Генотипування мутацій 185delAg та 5382insC в гені BRCA1 проведені у крові 74 хворих на РМЗ, 42 родичів I ступеня спорідненості, 24 пацієнтки – практично здорові (контрольна група).

Загальну геномну ДНК виділяли з крові згідно зі стандартним протоколом з використанням протеїнази K та додецилсульфату натрію в якості детергенту.

Для генотипування по гену BRCA1 проводили ампліфікацію відповідного фрагменту ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням розроблених мною пар праймерів RV1001 (5'-GACGTTGTCATTAGTTCTTTGGTTTTG-3') + RV1002 (5'-TGCTGACTTACCAGA TGGGAGACT-3') для мутації 185delAG та RV1003(5'-CCTGAATGCCTTAAATATGACGTG3') +RV1004(5'-GAGCTTTACSTTTCCGTCCTGGG3') для мутації 5382insC. Кількість ДНК для проведення ПЛР становила 50 нг на реакцію. Ампліфікацію ДНК проводили в середовищі такого складу: 1× буфер для ПЛР (PCR-buffer, Qiagen, США), MgCl<sub>2</sub> – 2 мМ, суміш dNTP – 0,4 мМ кожного,

праймери – 1 мМ кожного, ДНК-полімераза (HotStartTaq, Qiagen) – 3 од. активності на реакцію. Загальний об'єм реакційної суміші складав 50 мкл. ПЛР проводили з використанням ампліфікатора РТС-100 (MJ Research Inc, США) за такою програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази – 95°C, 2 хв.; (2) денатурація ДНК – 94°C, 45 с; (3) гібридизація праймерів – 54°C, 40 с; (4) синтез ДНК – 72°C, 1 хв.; (5) закінчення ампліфікації – 72°C, 8 хв.; (6) припинення реакції – 4°C. Загальна кількість циклів ампліфікації – 35. Аналіз результатів ПЛР проводили методом електрофорезу у 2 % агарозному гелі. Для візуалізації ДНК гель забарвлювали етидієм бромідом та фотографували в ультрафіолетовому світлі на установці GelDoc 2000 (BioRad, США). Для визначення довжини отриманих фрагментів їх електрофоретичну рухливість порівнювали з рухливістю ДНК-маркера Gene Ruler DNA Leader Mix (Fermentas, Литва).

Для виявлення поліморфізму у гені BRCA1 отримані продукти ПЛР обробляли сумішню рестриктаз Hinf I + Dra I у випадку мутації 185delAG та Bse I + Hind III у випадку мутації 5382insC. Реакцію проводили згідно з рекомендаціями виробника ферментів (Fermentas, Литва). Отримані рестриктні фрагменти аналізували методом електрофорезу у 10 % поліакриламідному гелі. Очікувані довжини фрагментів ДНК та розташування сайтів пізнання застосованих рестриктаз проводили за допомогою пакету програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR із використанням послідовності гену BRCA1, яка наявна у базі даних Genbank.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Відповідно частоті прояву злоякісних пухлин у родичів хворих на РГЗ ці родоводи були розділені на 6 груп. У першу групу увійшли сім'ї з пробандом із накопиченням РГЗ двома та більшим числом родичів. У другій групі сімей, крім пробанда, була хвора на РГЗ одна родичка. Крім того, у членів сімей перших двох груп виявлено пухлини органів репродуктивної системи і злоякісні новоутворення іншої локалізації. В третій групі спостерігалась агрегація злоякісних пухлин органів репродуктивної системи (тіла матки і яєчників). В четвертій групі відзначено накопичення злоякісних пухлин різного генезу. В п'ятій – онкологічними захворюваннями хворів один родич. В шостій групі родичів з онкологічною патологією не виявлено.

Аналіз показав, що у 82 родин (41 %), які увійшли у першу і другу групи, РГЗ у родичів першого і другого ступеня спорідненості зустрічаються в 73 випадках, причому в першій групі значна кількість осіб з даною онкопатологією склала 46.

Аналіз даних клініко-генеалогічного обстеження дозволив виявити 16 сімей, у яких рак молочної залози прослідковується в трьох патологічних родинах пробанда по материнській лінії, що дає змогу розцінювати цей факт як вертикальну

передачу патології. У 12 хворих РГЗ та 15 їх родичів відповідно даним клініко-генеалогічного аналізу були виявлені первинно-множинні пухлини. У цих людей, крім РГЗ, було відзначено виникнення раку тіла матки, рак яєчників, шлунка, шкіри.

Все вищезазначене, свідчить про необхідність застосування досить простого методу клініко-генеалогічного аналізу родоводів хворих на РГЗ, для визначення спадкового компонента схильності до виникнення пухлин, а також дає можливість сформулювати групи ризику по онкопатології з метою розробки індивідуального підходу до проведення оптимальних схем лікування хворих на РГЗ, у розвитку якого встановлений фактор спадковості.

Наступним етапом даного дослідження стало вивчення мутацій гену BRCA1. За даними літератури, яка аналізувалася стало відомо, що даний ген містить декілька мутацій, але найбільш поширеними є саме такі мутації: 5382 ins C; 185 del Ag.

Серед населення Чернівецької області було досліджено розповсюдженість двох мутацій у гені BRCA1: 185delAG та 5382insC. Ці дві мутації було обрано для дослідження тому, що згідно із даними літератури вони підвищують ризик виникнення раку та належать до найбільш поширених серед населення Східної Європи.

Ідентифікації мутацій у гені BRCA1 проводили методом ПЛР-ампліфікації бажаної ділянки гену з використанням специфічних праймерів з наступною обробкою отриманих ПЛР-продуктів рестриктазами для виявлення поліморфізму послідовності ДНК. Ідея методу ґрунтується на тому, що порушення нуклеотидної послідовності гену внаслідок мутації призводить до появи або зникнення сайту впізнання певної рестриктази. Останнє може бути виявлено як зміна у наборі рестриктних фрагментів. Відповідно, на першому етапі дослідження з використанням інформації, наявної у базі даних Genbank було розраховано розташування у гені BRCA1 сайтів впізнання рестриктаз, застосованих у експериментах та очікувані розміри фрагментів рестрикції.

В результаті ПЛР-ампліфікації для всіх досліджених зразків ДНК було одержано ПЛР-продукти, розміри яких відповідали очікуванім, а саме – 254 нп для мутації 185delAG та 187 нп – для 5382insC. На наступному етапі експериментів отримані ПЛР-продукти обробляли сумішню двох рестриктаз кожний. При цьому одна із рестриктаз застосовувалась для ідентифікації поліморфізму у послідовності ДНК (185delAG – рестриктаза Hinf I, 5382insC – рестриктаза Bse I). Введення до складу реакційної суміші другої рестриктази (відповідно Hind III або Dra I) призводило до появи додаткового рестриктного фрагменту постійної довжини, який являв собою внутрішній контроль для кожного досліджуваного зразка. Результати електрофоретичного розділення продуктів рестрикції, отриманих для 10 пробандів наведено на рисунку 1. Аналогічні результати

було отримано і для решти досліджених зразків ДНК. Порівняння наборів отриманих фрагментів свідчить, що серед 40 досліджених пробан-

дів було виявлено одну людину – носія мутації 5382insC у гомозиготному стані. Носіїв мутації 185delAG виявлено не було.

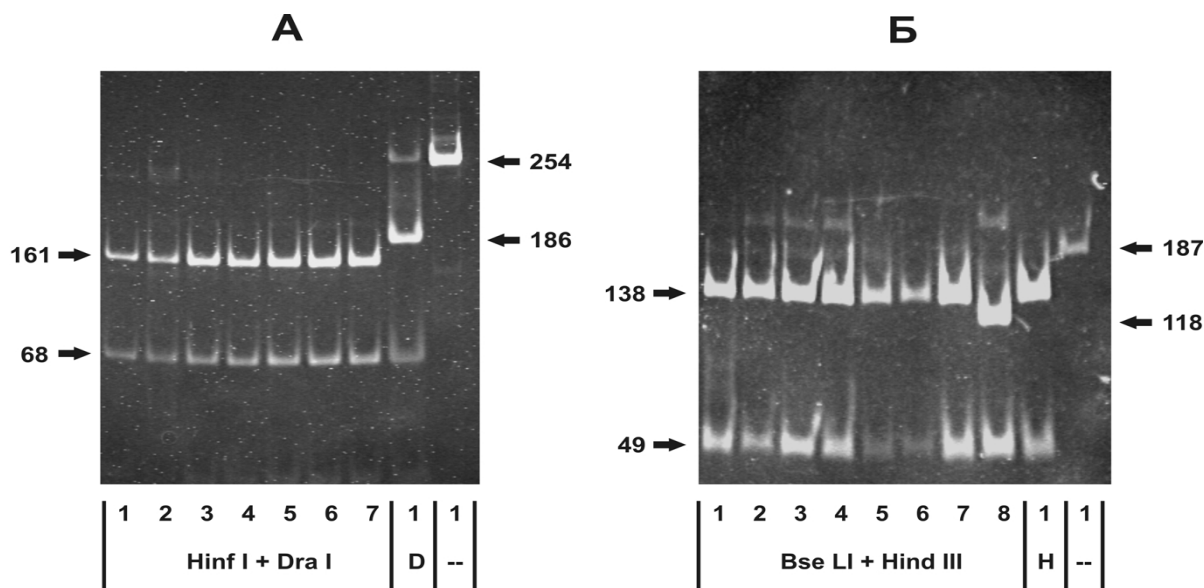


Рис. 1. Генотипування мутацій 185delAG (А) та 5382insC (Б) у гені BRCA1. Результати електрофоретичного розділення рестриктних фрагментів, які утворилися за дії рестриктаз Hinf I, Dra I (D), Bse I та Hind III (H) на ПЛР-продукти. Цифрами під малюнком позначено номери зразків ДНК.

Загальноприйнято, що скринінгу повинні підлягати кожні 6 – 12 міс. усі пацієнтки, що відносяться до групи моногенно-детермінованого ризику, починаючи з віку 25 років або на 10 років раніше того віку, в якому розвинулася пухлина у наймолодшого родича першого ступеня спорідненості [2, 3, 8]. Проте жоден з нині існуючих скринінгових тестів і їх комбінацій, на жаль, не забезпечують точної діагностики пухлин на доклінічних етапах розвитку.

Таким чином, незважаючи на розробку нових методів і технологій скринінгу і лікування раку, проблема ранньої діагностики і профілактики спадкових пухлин сьогодні упирається у відсутність організаційної системи, здатної виявити і зареєструвати контингент осіб із спадковим онкоризиком і забезпечити цих осіб адекватною діагностичною і лікувально-оздоровчою допомогою. Альтернативним підходом до вирішення цієї проблеми є створення в загальній системі охорони здоров'я спеці-

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Боднар Г.В., Седаков І.Е., Кайряк О.В. BRCA1 і BRCA2 у больных раком молочной железы Донецкой области / Г.В. Боднар, І.Е. Седаков, О.В. Кайряк [и др.] // Медико-соціальні проблеми сім'ї. — 2009. — Т.14, № 4. — С. 53—58.
2. Зборовская И.Б. Молекулярно-биологические исследования онкогенов и генов-супрессоров в практике клинической онкологии / И. Б. Зборовская // Канцерогенез. — М.: Медицина. — 2004. — С. 361—379.
3. Зорин В., Кербер Р. Прогностическое значение семейного анамнеза для выживаемости онкологических больных / В. Зорин, Р. Кербер // Вопр. онкол. — 2001. — Т. 47, № 4. — С. 396—400.
4. Мушкамбаров Н.Н. Молекулярная биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. — М.: Мед. информ. агентство, 2003. — С. 535.
5. Пальцев М.А. Введение в молекулярную медицину / М.А. Пальцев. — М.: Изд. Медицина, 2004. — 496 с.
6. Brekelmans Survival and prognostic factors in BRCA1-associated breast cancer / С.Т. Brekelmans, С. Seynaeve, М. Menke-Pluymers [et al.] // Ann Oncol. — 2006. — № 17. — Р. 391—400.

7. Meyer P. Twenty three novel BRCA1 and BRCA2 sequence alterations in breast and or ovarian cancer families in Southern Germany / P. Meyer, T. Voiglaender, C. R. Bartram, R. Klaes // Hum. Mut. — 2003. — Vol. 22, № 3. — P. 259.
8. Skasko E. The presence of the hereditary BRCA1 gene mutations in women with familial breast or ovarian cancer and the frequency of occurrence of these tumors in their relatives / E. Skasko, Z. Paszko, A. Niwinska [et al.] // Eur. J. Gynec. Oncol. — 2004 — Vol. 25, № 4. — P. 470—474
9. Tilanus-Linthorst Selection bias influences reported contralateral breast cancer incidence and survival in high risk non-BRCA1/2 patients / M.M. Tilanus-Linthorst, K.C. Bartels, C. Alves [et al.] // Breast Cancer Res Treat. — 2006. — № 95. — P. 117—123.

<sup>1</sup>T.V. KRUK, <sup>2</sup>A.P. PERESUNKO, <sup>1</sup>R.A. VOLKOV

<sup>1</sup>*Bukovynskyy State Medical University, Department of Oncology and Radiology, Chernivtsi;*

<sup>2</sup>*Chernivetsky National University. YF.Fedkovycha, Department of Oncology and Radiology, Chernivtsi*

CLINICAL AND GENEALOGICAL AND MOLECULAR GENETIC STUDIES OF PATIENTS WITH BREAST CANCER – THE BASIS OF PREVENTION AND EARLY DETECTION OF CANCER

An analysis of clinical and family history and incidence of mutations in the BRCA1 gene in patients with breast cancer and their relatives in the Chernivtsi region of Ukraine. The results of this study confirm the need for special medical genetic survey of families with presence in pedigrees of patients with cancer of various localizations. In order to improve early diagnosis and prevention of cancer.

**Key words:** Breast cancer, clinical and genealogical history, gene mutations BRCA1

**Стаття надійшла до редакції: 4.03.2013 р.**