

КЛІНІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 618.19-006:616-001. 28:575 (083.13)

Л. А. Рибченко, Г. М. Бичкова, Г. В. Скибан,
Н. Є. Ярошенко, С. В. Клименко*

Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини
Національної академії медичних наук України”,
вул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050, Україна

**АНАЛІЗ ЧАСТОТИ НАЙБІЛЬШ ПОШИРЕНИХ
МУТАЦІЙ ГЕНІВ *BRCA1* ТА *BRCA2* У ЖІНОК,
ЯКІ БРАЛИ УЧАСТЬ У ЛІКВІДАЦІЇ НАСЛІДКІВ
ЧОРНОБИЛЬСЬКОЇ КАТАСТРОФИ**

Досліджено частоту мутацій у генах *BRCA1* та *BRCA2* у жінок — ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС. Показано, що мутація 5382insC гена *BRCA1* домінує серед досліджуваного спектру мутацій і складає 5,9% у групі хворих на рак молочної залози (РМЗ) жінок та 1,1% у групі жінок без РМЗ.

Ключові слова: рак молочної залози, мутації, гени *BRCA1* та *BRCA2*, молекулярно-генетичний аналіз, клініко-генеалогічне обстеження, аварія на ЧАЕС.

Вступ. Рак молочної залози (РМЗ) є найбільш поширеним онкологічним захворюванням серед жіночого населення України і складає майже 20% від загальної захворюваності жінок на рак. Протягом останніх років РМЗ в Україні виникає приблизно у 17 тис. жінок щорічно (у 2009 р. захворіло 16 254 жінки, у 2010 р. — 17 232). Майже 8 тис. хворих щорічно помирає (у 2009 р. — 7989 жінок, у 2010 р. — 7899) [1].

Останнім часом все більше уваги приділяють генетичному та радіаційному факторам розвитку РМЗ. Доведено, що молочна залоза має високу чутливість до канцерогенної дії іонізуючої радіації. За результатами досліджень А. Є. Присяжнюка зі співавт., спостерігається статистично значущий ріст захворюваності у жінок-ліквідаторів, яким на момент Чорнобильської аварії було 21–45 років, однак відмічено, що шкідлива дія іонізуючої радіації внаслідок аварії на ЧАЕС не має значного впливу на рівень захворюваності на РМЗ в Україні в цілому [2]. За даними

* Клименко Сергій Вікторович, e-mail: klymenko_sergiy@yahoo.co.uk
© Рибченко Л. А., Бичкова Г. М., Скибан Г. В., Ярошенко Н. Є., Клименко С. В., 2012

C. E. Land зі співавт., виявлено надлишок радіаційно-обумовлених випадків РМЗ серед опромінених жінок після атомного бомбардування Хіросіми та Нагасакі. Визначено позитивний кореляційний зв'язок між ризиком розвитку патології та віком на момент опромінення, а також часом, який минув з моменту впливу канцерогена. Збільшення частоти розвитку РМЗ спостерігалось тільки через 15–30 років після катастрофи у когорті жінок, яким на момент бомбардування було від 10 до 19 років [3].

Провідне місце серед генетичних факторів, які відіграють роль у розвитку РМЗ, займають мутації у генах *BRCA1* та *BRCA2*. Ці мутації зустрічаються у 20–30% хворих з сімейними випадками РМЗ та раку яєчників (РЯ) [4]. *BRCA1* та *BRCA2* є супресорними генами з аутосомно-домінантним типом успадкування та високою пенетрантністю в межах однієї сім'ї. Обидва гени є досить великими і налічують 80 тисяч нуклеотидних пар, а спектр їх молекулярних варіантів досягає декількох сотень, що значно ускладнює тестування мутаційного статусу. Однак відомо, що для різних етнічних груп є характерним носійство певних алельних варіантів генів *BRCA1* та *BRCA2*. Найбільш чітко це простежується в популяції євреїв-ашкеназі та у корінних мешканців Ісландії [5, 6]. В Ісландії переважає мутація 999del5 в гені *BRCA2* (популяційна частота її серед ісландців становить 1:200). Для євреїв-ашкеназі специфічними є дві мутації у гені *BRCA1* (185delAG та 5382insC) та одна мутація у гені *BRCA2* (6174delT), що проявляються з високою частотою і складають більше 90% всіх мутацій у єврейській популяції. Зазначимо, що мутації 185delAG, 5382insC у гені *BRCA1* та 6174delT у гені *BRCA2*, характерні для євреїв-ашкеназі, також посідають провідне місце поміж алельних варіантів цих генів у російській, польській та українській популяціях [4, 7–10], що свідчить про значний внесок ефекту “попередника” у формування спектру мутацій *BRCA1* та *BRCA2* у східних слов'ян. Досліджено, що спадкові мутації 185delAG, 5382insC у гені *BRCA1* та алельний варіант 6174delT гену *BRCA2*, за даними різних дослідників, зустрічаються з частотою від 3,8% до 11,4% серед жінок з РМЗ в Україні [9, 11].

Досліджені носійства мутацій у генах *BRCA1* та *BRCA2* у жінок-ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС в Україні не проводилося.

Мета дослідження: встановити частоту носійства мутацій у генах *BRCA1* та *BRCA2* у жінок-ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС, провести порівняльний аналіз частоти мутацій *BRCA1* та *BRCA2* у жінок-ліквідаторів, хворих на РМЗ (радіаційно-асоційоване захворювання), та у жінок, хворих на спонтанний РМЗ, розвитку якого не передувала дія канцерогену.

Матеріал та методи дослідження. В дослідження включено 327 жінок, які були розподілені на чотири групи. Перша група була сформована з 72 жінок, хворих на РМЗ, які брали участь у ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС; друга — з 80 пацієнток зі зложісними новоутвореннями молочної залози, які не зазнали впливу іонізуючого випромінювання внаслідок аварії на ЧАЕС; 160 жінок без РМЗ, які брали участь у ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС, склали третю групу дослідження; в четверту групу включено 15 практично здорових жінок, не пов'язаних з аварією на ЧАЕС. Середній вік жінок на час участі в ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС в першій групі склав ($33,1 \pm 7,3$) року, в третій групі — ($36,6 \pm 7,8$). Дані про кожну жінку були занесені до спеціально розроблених карт опитування і включаючи інформацію про анамнез життя та захворювання, результати обстежень. Дані були отримані з історії хвороб, амбулаторних карт та під час опитування жінок.

Геномна ДНК екстрагувалась із зразків периферичної крові з використанням набору Nucleospin DNA Mini-Kit (Duren, Німеччина) та з фіксованих формаліном і залитих парафіном зразків тканини пухлини з використанням набору для виділення ДНК Quiamp DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Німеччина) відповідно до інструкцій виробників. Були використані умови ампліфікації ДНК і послідовність праймерів для ідентифікації мутацій 5382ins і 185delAG гену *BRCA1*, 6174delT гена *BRCA2*, опубліковані Chan зі співавторами, [12]. Ампліфікацію ДНК здійснювали за допомогою термоциклеру Gene-Amp PCR 2400 (Applied Biosystems, США) та реагентів GoTaq Green PCR Master Mix (Promega, США). Продукти полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для візуалізації розділяли відповідно до молекулярної ваги за допомогою електрофорезу у 2,5% агарозному гелі із забарвленням етидію бромідом. Параметричні показники порівнювали за допомогою t-тесту в двобічному варіанті. Непараметричні дані оцінювали з використанням точного тесту Фішера у двобічному варіанті. Асоціативні зв'язки оцінювали за допомогою коефіцієнта рангової кореляції Спірмена. Статистичні розрахунки виконували за допомогою програмного пакету Statistica 5,5 (StatSoft, США). Твердження про наявність істотних розбіжностей припускали за вірогідності помилки менше 0,05.

Результати та їх обговорення. Жінкам з усіх чотирьох груп було проведено клініко-генеалогічне обстеження. Аналіз родоводів жінок з першої групи показав: у 25 хворих (34,7%) немає близьких родичів з будь-якою онкопатологією, у родоводах 11 жінок (15,3%) відмічено один та більше випадків РМЗ та/або РЯ, а у родичів 36 пацієнток (50%) визначено іншу

онкологічну патологію. У 32 (40%) жінок з другої групи не виявлено родичів з онкопатологією, а у 14 (17,5%) пацієнток було відмічено один та більше випадків РМЗ та/або РЯ у сімейному анамнезі, 46 (57,5%) хворих мали у родоводі випадки пухлин різної локалізації. Перша та друга групи були стандартизовані за віком на час встановлення діагнозу РМЗ: середній вік хворих з першої групи на момент встановлення діагнозу РМЗ склав ($49,3 \pm 6,7$) року, а другої — ($48,8 \pm 6,7$) року. На момент обстеження понад 90% пацієнток з обох цих груп мали І та ІІ стадію захворювання. При генеалогічному дослідженні жінок з третьої групи виявилось, що 82 з них (51,2%) мали близьких родичів зі злоякісними новоутвореннями, не пов'язаними з статевою сферою, а у родичів 17 жінок (10,6%) був присутній РМЗ та/або РЯ. Також у самих жінок з цієї групи була зареєстрована різноманітна патологія: у 7 пацієнток мала місце онкологічна патологія, не пов'язана зі статевою сферою — рак щитоподібної залози було встановлено у двох жінок, у двох пацієнток діагностовано рак шлунку. Одна жінка з третьої групи мала рак шкіри, одна — РЯ, та ще одна — рак шийки матки. У 106 жінок з цієї ж групи діагностовано іншу патологію молочної залози, а саме 68 (42,5%) з них мали мастопатію, 35 (21,9%) — фіброаденоматоз молочної залози, 1 (0,6%) — ліпоматоз, а у двох жінок (1,2%) були виявлено кістозні утворення молочної залози. Характеристика четвертої групи виглядає наступним чином: у родоводах трьох жінок цієї групи (20%) виявлено по одному родичу з РМЗ (у двох випадках це родичі першого ступеня спорідненості, в одному — другого ступеня спорідненості), інші три пацієнтки (20%) мали родичів з онкопатологією (в однієї з жінки у родоводі виявлено 6 випадків раку). У самих жінок з четвертої групи зареєстрована різноманітна патологія: одна пацієнтика мала рак сечового міхура, у 7 (46,7%) обстежених спостерігалась патологія молочних залоз — у 4 (27%) мастопатія, у двох (13%) — фіброаденоматоз, а в одному (6,7%) випадку — полікістоз.

Усім пацієнткам проведено молекулярно-генетичний аналіз на наявність мутацій 5382ins і 185delAG у гені *BRCA1* та мутації 6174delT у гені *BRCA2*. Встановлено, що частота мутацій у жінок, хворих на РМЗ, з першої групи склала 5,6% (n=4). У однієї жінки виявлена мутація 185delAG у гені *BRCA1*, у трьох жінок — мутація 5382insC у гені *BRCA1*. У хворих другої групи виявлено 6,2% (n=5) мутацій, усі випадки представлені алельним варіантом 5382insC у гені *BRCA1*. У жінок третьої групи частота мутацій склала 1,2% (у двох жінок виявлена мутація 5382insC у гені *BRCA1*), а в четвертій групі не виявлено жодної з досліджених мутацій. Результати проведених молекулярно-генетичних досліджень узагальнені в табл. 1.

Таблиця 1. Частота мутацій у генах *BRCA1* та *BRCA2* у жінок з чотирьох груп дослідження

	Перша група (n=72)	Друга група (n=80)	Третя група (n=160)	Четверта група (n=15)	Всі обстежені (n=327)
<i>BRCA1</i> 185delAG	1 (1,4%)	—	—	—	1 (0,3%)
<i>BRCA1</i> 5382insC	3 (4,2%)	5 (6,2%)	2 (1,2%)	—	10 (3%)
<i>BRCA2</i> 6174delT	—	—	—	—	—
Всього	4 (5,6%)	5 (6,2%)	2 (1,2%)	—	11 (3,3%)

Дані, наведені в табл. 1, свідчать, що мутація 5382insC у гені *BRCA1* домінує серед інших мутацій, натомість алельний варіант 6174delT гена *BRCA2* не виявлено у жодній пацієнтки з усіх чотирьох груп. Встановлено, що частота мутацій у хворих на РМЗ жінок з першої та другої груп в цілому склала 5,9% (n=152), значущої різниці за частотою мутацій між першою та другою групами виявлено не було (5,6% та 6,2%, відповідно). Частота мутацій у жінок без РМЗ (третя та четверта групи) склала 1,1% (n=175). Ці дані дозволяють зробити висновок про значущу різницю за частотою мутацій між групою жінок, хворих на РМЗ, та групою жінок без РМЗ (5,9% та 1,1% відповідно).

Ми зіставили дані про частоти виявленіх мутацій з даними родоводів обстежених жінок та отримали наступні результати: у першій групі одна мутація 185delAG та дві мутації 5382insC гену *BRCA1* виявлені у жінок із сімейною історією РМЗ (один і більше випадків РМЗ у родоводі), а одна мутація 5382insC гену *BRCA1* була визначена у жінки, що не мала родичів з будь-якою онкопатологією. У жінок другої групи мутації було ідентифіковано тільки у хворих, родоводи яких містили дані про випадки РМЗ та РЯ серед родичів першого та другого рівня спорідненості. У третій групі одна мутація 5382insC гену *BRCA1* виявлена у пацієнтки, мати якої хворіла на РМЗ, а друга — у жінки, бабуся якої хворіла на рак матки. У пацієнток четвертої групи не було виявлено жодної із досліджуваних мутацій. Визнано статистично значущий асоціативний зв'язок між наявністю випадків РМЗ та/або РЯ серед родичів першого та другого рівня спорідненості з наявністю у хворих на рак молочної залози мутації генів *BRCA1* та *BRCA2* ($r_s=0,49$, $p<0.000001$). Тісна кореляція визнана й окремо для хворих, які постраждали внаслідок аварії на ЧАЕС, та пацієнтів зі спонтанним РМЗ ($r_s=0,4$, $p<0.0005$ та $r_s=0,56$, $p<0.000001$ відповідно). Подібна тенденція не виявлена в обстежених жінок без РМЗ, що може

бути зумовлено значно меншою частотою мутації генів *BRCA1* та *BRCA2* серед них, порівняно із хворими на РМЗ, і як наслідок, необхідністю суттєво більшого об'єму вибірки. Ці дані також підтверджують наявність спадкової схильності до розвитку РМЗ.

Висновки

1. Вперше в Україні досліджено частоту мутацій у генах *BRCA1* та *BRCA2* у жінок — ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС. Виявлена статистично значуща різниця за частотою мутацій між групою жінок, хворих на РМЗ, та групою жінок без РМЗ.
2. У результаті порівняння груп хворих на радіаційно-асоційований та спонтанний РМЗ не визначено статистично значущої різниці за частотою мутації генів *BRCA1* та *BRCA2* між цими групами.
3. Показано, що мутація 5382insC гена *BRCA1* домінує серед досліджуваного спектру мутацій і складає 5,9% (n=152) у групі хворих на РМЗ жінок та 1,1% (n=175) у групі жінок без РМЗ.
4. Мутацію 6174delT гена *BRCA2* не виявлено у жодної з 327 обстежених пацієнток з усіх чотирьох груп.
5. Визначено статистично значущий асоціативний зв'язок між наявністю випадків РМЗ та/або РЯ серед родичів першого та другого рівня спорідненості з наявністю у хворих на рак молочної залози мутації генів *BRCA1* та *BRCA2*. Ці дані підтверджують наявність спадкової схильності до розвитку захворювання на РМЗ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Рак в Україні, 2010–2011 [Електронний ресурс] / під ред. І. Б. Щепотіна // Бюлєтень Національного канцер-реєстру України. — 2012. — № 13. — Режим доступу : <http://users.iptelecom.net.ua/~iscr/>.
2. Захворюваність на рак молочної залози жіночого населення України до та після аварії на ЧАЕС / А. Є. Присяжнюк, А. Ю. Романенко, М. М. Фузік [та ін.] // Журн. АМН України. — 2007. — Т. 13. — № 4. — С. 676–687.
3. Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950–1990 / C. E. Land, M. Tokunaga, K. Koyama [et al.] // Radiat. Res. — 2006. — Vol. 160. — P. 707–717.
4. Имянитов Е. Н. Наследственный рак молочной железы / Е. Н. Имянитов // Практич. онкология. — 2010. — Т. 11, № 4. — С. 258–266.
5. Metcalfe K. A. Screening for founder mutations in *BRCA1* and *BRCA2* in unselected Jewish women / K. A. Metcalfe // J. Clin. Oncol. — 2010. — Vol. 28, № 3 — P. 387–391.
6. Tulinius H. The effect of a single *BRCA2* mutation on cancer in Iceland / H. Tulinius // Med. Genet. — 2002. — Vol. 39. — P. 457–462.
7. Наследственные мутации при ранних, семейных и билатеральных формах рака молочной железы у пациенток из России / А. П. Соколенко, М. Е. Розанов, Н. В. Митюшкина [и др.] // Сиб. онкол. журн. — 2008. — Т. 27, № 3. — С. 43–49.

8. *BRCA1 and BRCA2 point and large rearrangements in breast and ovarian cancer families in Northern Poland* / M. Ratajska, I. Brozek, E. Sencus-Kolefka [et al.] // Oncol. Rep. — 2008. — Vol. 19, N 1. — P. 263–268.
9. Аналіз мутацій у генах BRCA1/2 у хворих на сімейний/спадковий рак молочної залози, які проживають у Львівській області (Україна) / Н. І. Кіцера, Я. В. Шпарик, Б. Т. Білинський [та ін.] // Онкологія. — 2012. — Т. 14, № 1. — С. 44–49.
10. Breast cancer immunohistochemical features in young women with *BRCA1/2* mutations / L. M. Zakhartseva, N. G. Gorovenko, S.V. Podolskaya [et al.] // Exp. Oncol. 2009. — Vol. 31. — P. 174–178.
11. Хоссейн Расси. Молекулярно-генетичні маркери раку молочної залози у осіб різних вікових груп : Автoreферат дис. ... канд. біол. наук / Київ. мед. академія після диплом. освіти ім. П.Л. Шупика. — К., 2008. — 20 с.
12. Simple and rapid detection of *BRCA1* and *BRCA2* mutations by multiplex mutagenically separated PCR / P. C. Chan, B. Y. Wong, H. Ozcelik [et al.] // Clin. Chem. — 1999. — Vol. 45, №8. — P. 1285–1287.

Стаття надійшла до редакції 18.06.2012.

Л. А. Рыбченко, А. М. Бычкова, Г. В. Скибан, Н. Е. Ярошенко, С. В. Клименко
Государственное учреждение “Национальный научный центр радиационной
медицины Национальной академии медицинских наук Украины”,
ул. Мельникова, 53, г. Киев, 04050, Украина

**АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫХ МУТАЦИЙ
ГЕНОВ *BRCA1* И *BRCA2* У ЖЕНЩИН, ПРИНИМАВШИХ УЧАСТИЕ
В ЛИКВИДАЦИИ ПОСЛЕДСТВИЙ ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ КАТАСТРОФЫ**

Исследована частота мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у женщин — ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС, показано, что мутация 5382insC гена *BRCA1* доминирует среди исследованного спектра мутаций и составляет 5,9% в группе женщин, больных раком молочной железы (РМЖ) и 1,1% в группе женщин без РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, мутации, гены *BRCA1* и *BRCA2*, молекулярно-генетический анализ, клинико-генеалогическое исследование, авария на ЧАЭС.

L. A. Rybchenko, A. M. Bychkova, G. V. Skyban, N. E. Yaroshenko, S. V. Klimenko
State Institution “National Research Center for Radiation Medicine
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”,
Melnikov str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine

**THE FREQUENCY ANALYSIS OF THE MOST COMMON MUTATIONS
IN GENES *BRCA1* AND *BRCA2* IN WOMEN, WHICH TOOK PART
IN THE LIQUIDATION OF CHORNOBYL DISASTER CONSEQUENCES**

The frequency of mutations in genes *BRCA1* and *BRCA2* was investigated among women-liquidators of Chornobyl disaster consequences; the 5382insC mutation of the *BRCA1* gene is dominant among the studied spectrum of mutations (it's frequency is 5.9% in the group of women with breast cancer (BC) and 1.1% in the group of women without BC).

Key words: *breast cancer, mutations, *BRCA1* and *BRCA2* genes, DNA-analysis, clinical and genealogical research, Chornobyl disaster.*