

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

Л. А. Рибченко✉, Л. О. Полубень, Г. М. Бичкова, Г. В. Стефанович, С. В. Клименко

Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», вул. Юрія Ілленка, 53, м. Київ, 04050, Україна

МУТАЦІЇ У ГЕНАХ *BRCA1* ТА *BRCA2* У ЖІНОК, ХВОРИХ НА РАК ЯЄЧНИКІВ, ЯКІ ЗАЗНАЛИ ВПЛИВУ ЧИННИКІВ ЧОРНОБИЛЬСЬКОЇ КАТАСТРОФИ

Мета: встановити частоту гермінальних мутацій 185delAG, 5382insC гена *BRCA1* і 6174delT гена *BRCA2* у хворих на рак яєчників (РЯ) в Україні, зокрема у жінок, які зазнали впливу чинників Чорнобильської катастрофи.

Матеріали і методи. У дослідження включено 306 хворих на РЯ різного віку, яким було проведено молекулярно-генетичне визначення мажорних мутацій в генах *BRCA1* і *BRCA2* за допомогою алель-специфічної мультиплексної полімеразної реакції.

Результати. Частота мутацій у хворих на РЯ з радіаційним анамнезом (основна група) склала 5,3 % (2 з 38). У хворих без радіаційного анамнезу (контрольна група) виявлено 11,2 % (30 з 268) випадків з мутацією. Проте значущої різниці в частоті мутацій між групами хворих виявлено не було ($p = 0,39$). Встановлено, що частота мутацій *BRCA1/2* у пацієнтів обох груп склала 10,4 % (32 із 306). На долю мутації 5382insC у гені *BRCA1* припадає 87,5 % (28 з 32) випадків з мутацією, натомість алельний варіант 6174delT гена *BRCA2* не виявлено у жодної пацієнтки обох груп. Виявлено тенденцію до більш раннього віку захворювання на РЯ у постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС з мутаціями порівняно з *BRCA*-позитивними особами контрольної групи ($p = 0,06$). При порівнянні хворих з *BRCA*-позитивним РЯ та *BRCA*-негативним РЯ основної когорти встановлено статистичну значущість щодо маніфестації захворювання у пацієнтів з мутаціями в більш ранньому віці ($p = 0,04$). Однак таких відмінностей не спостерігалось в контрольній групі ($p = 0,22$).

Висновки. Частота мутацій у хворих на РЯ з радіаційним анамнезом і без такого не відрізняється та залежить від спектру досліджуваних мутацій у генах *BRCA1/2*, від ступеня ампліфікації ДНК і чисельності вибірки. Алельний варіант 5382insC у гені *BRCA1* є домінуючим і становить 87,5 % від загальної кількості знайдених мутацій. Через дію радіаційного фактора захворювання на РЯ у *BRCA1*-позитивних осіб реалізується у більш ранньому віці, ніж у пацієнтів без мутацій. Захворюваність на РЯ спостерігалась тільки через 27–38 років після Чорнобильської катастрофи у когорті жінок, яким на момент аварії було від 4 до 40 років.

Ключові слова: рак яєчників, мутації в генах *BRCA1* та *BRCA2*, іонізуюча радіація, Чорнобильська катастрофа.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2019. Вип. 24. С. 455–464. doi: 10.33145/2304-8336-2019-24-455-464

✉ Рибченко Людмила Анатоліївна, e-mail: ribchenkol@i.ua

L. A. Rybchenko✉, L. O. Poluben, G. M. Bychkova, G. V. Stephanovych, S. V. Klymenko

State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 53 Yurii Illienka St., Kyiv, 04050, Ukraine

MUTATIONS OF GENES *BRCA1* AND *BRCA2* IN WOMEN WITH OVARIAN CANCER EXPOSED TO FACTORS OF CHORNOBYL NUCLEAR ACCIDENT

Objective: to determine a frequency of germline mutations 185delAG, 5382insC in *BRCA1* gene and 6174delT in *BRCA2* gene in Ukrainian patients with OC including women who were exposed to the factors of Chernobyl nuclear accident.

Material and methods. In the study we enrolled 306 OC patients of different age who were tested for the presence of the major *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations using allele specific multiplex polymerase chain reaction.

Results. The mutation frequency in patients exposed to IR with OC (main group) was 5.3 % (2 from 38). Among unexposed patients (control group) 11,2 % (30 from 268) of cases with mutation were identified. However, the difference between the groups was not significant ($p = 0.39$). It was shown that the *BRCA1/2* mutations frequency in the patient of both groups was 10,4 % (32 from 306). The mutation *BRCA1* 5382insC was positive in 87.5 % (28 from 32) of cases, nevertheless nobody was identified with the allelic variant *BRCA2* 6174delT among both groups. There was a tendency toward an earlier age of the OC manifestation in the patients exposed to IR due to Chernobyl nuclear accident compared to *BRCA*-positive women of the control group ($p = 0.06$). When comparing *BRCA*-positive and *BRCA*-negative patients with OC of the main group, there was a statistical significance regarding the earlier age of the disease manifestation in the patients with mutations ($p = 0.04$). However, such difference was not observed in the control group ($p = 0.22$).

Conclusions. The frequency of the mutations in exposed to IR and unexposed patients with OC does not differ and depends on a spectrum of studied *BRCA1/2* gene mutations, level of DNA amplification and sample number. The allelic variant *BRCA1* 5382insC is dominant and accounts for 87.5 % of the total number of the found mutations. Due to the radiation factor the OC in the *BRCA1*-positive individuals is realized at the earlier age than in patients negative for these mutations. The incidence of OC after the Chernobyl accident was observed 27–38 years later in a cohort of women who were from 4 to 40 years old at the moment of the nuclear explosion.

Key words: ovarian cancer, *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations, ionizing radiation, Chernobyl nuclear accident.

Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2019;24:455-464. doi: 10.33145/2304-8336-2019-24-455-464

ВСТУП

Рак яєчників (РЯ) в Україні посідає перше місце в структурі смертності від гінекологічних ракових захворювань і сьоме місце з результатом 4,8 % від усієї кількості первинно діагностованих новоутворень серед жінок [1].

Однією з причин виникнення РЯ є спадкова схильність, реалізація якої може залежати від дії іонізуючої радіації. Приблизно 10–15 % всіх пухлин яєчників припадає на долю спадкового РЯ [2, 3]. Найбільшим досягненням у вивченні спадкових форм РЯ стало відкриття генів *BRCA1* і *BRCA2* – супресорних генів з аутосомно-домінантним типом успадкування та високою пенетрантністю в межах однієї сім'ї. Для носіїв мутації *BRCA1* і *BRCA2* ризик захворювання на РЯ становить 39 % та 11 %, відповідно [4]. Натомість, для жінок без мутацій ри-

INTRODUCTION

In Ukraine ovarian cancer (OC) is on the first place in the structure of mortality from gynecological malignancies, and on the seventh place among primary diagnosed neoplasms in women, 4.8 % out of the total number [1].

One of the OC causes is hereditary predisposition, the realization of which may depend on the influence of ionizing radiation (IR). Approximately 10–15 % of all ovarian tumors are hereditary [2, 3]. The greatest achievement in the study of hereditary OC was the discovery of *BRCA1* and *BRCA2* suppressor genes with autosomal dominant type of inheritance and high penetrance within one family. The risk of OC manifestation for *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers is 39 % and 11 %, respectively [4]. In return, for women negative for these

✉ Liudmila I. Shvaiko, e-mail: pulmoaid@i.ua

зик захворювання на РЯ складає 1,5 % [5]. В Україні, як і в інших країнах Східної Європи, мажорними мутаціями в генах *BRCA1* та *BRCA2* вважаються алелі 185delAG, 5382insC, 4153delA, 300T>G та 6174delT [6–11]. Відомо, що здорові носії мутації у гені *BRCA1* мають підвищений рівень радіочутливості [12], що може спричинити розвиток злоякісного новоутворення, зокрема РЯ. Визначення мутацій в генах *BRCA1* і *BRCA2* є передумовою до визначення раціональних підходів у лікуванні та індивідуалізації терапії РЯ, а також профілактики розвитку даного захворювання.

МЕТА

Мета дослідження: визначити частоту гермінальних мутацій 185delAG, 5382insC гена *BRCA1* та 6174delT гена *BRCA2* у хворих на РЯ, зокрема у жінок, які зазнали впливу чинників Чорнобильської катастрофи.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження виконано відповідно до принципів Гельсінської декларації після затвердження дослідження Комітетом з медичної етики ННЦРМ. Проведено та проаналізовано молекулярно-генетичне дослідження біологічних зразків 306 хворих на РЯ жінок різного віку, які були розподілені на 2 групи. Основну когорту склали 38 пацієток з РЯ, які зазнали дії іонізуючої радіації (ІР) внаслідок Чорнобильської катастрофи: 3 жінки були учасницями ліквідації наслідків аварії (УЛНА) на ЧАЕС, 2 особи було евакуйовано з 30-км зони та 35 осіб проживали на територіях, забруднених радіонуклідами. Контрольну групу було сформовано із 268 осіб без радіаційного анамнезу зі злоякісними новоутвореннями в яєчниках. Критеріями включення у дослідження були: наявність інформованої згоди на проведення дослідження, вік пацієнтів від 15 років до 70 років, наявність встановленого діагнозу РЯ.

Пацієнти основної групи з радіаційно-асоційованим РЯ і контрольної групи без радіаційного анамнезу були стандартизовані за віком на час встановлення діагнозу ($p = 0,45$). Середній вік хворих основної групи склав ($51,5 \pm 9,0$) років, контрольної – ($51,7 \pm 10,2$) років. Розподіл хворих на РЯ за віком на час верифікації діагнозу наведено в табл. 1.

Матеріалом дослідження для пацієнтів основної групи слугували архівні зразки тканини яєчників, для групи контролю – зразки периферичної крові, надіслані з 22 медичних установ України, де лікували пацієток.

mutation the OC development risk is 1.5 % [5]. In Ukraine, as in other Eastern European countries, the major mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes are 185delAG, 5382insC, 4153delA, 300T>G and 6174delT [6–11]. It is known that healthy *BRCA1* mutation carriers have an elevated level of radiosensitivity [12], this may cause the development of a malignant neoplasm, in particular OC. The detection of *BRCA1* and *BRCA2* mutations is a prerequisite for the definition of rational approaches in the treatment and individualization of OC therapy, as well as the prevention of the development of this disease.

OBJECTIVE

To determine a frequency of germline mutations 185delAG, 5382insC in *BRCA1* gene and 6174delT in *BRCA2* gene in Ukrainian patients with OC including women who were exposed to the factors of Chernobyl nuclear accident.

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted in accordance with the principles of the Helsinki Declaration and approved by Committee of Medical Ethics of NRCRM. The biological samples from 306 OC patients of different age were used for molecular genetic analysis. All patients were divided into two groups. A main group included 38 patients with OC who were exposed to IR due to Chernobyl nuclear accident: three of them were follow-up workers of the accident consequences, two women were evacuated from 30 km zone, and 35 women were residents of contaminated with radionuclides territories. A control group consisted of 268 unexposed to IR individuals with ovarian malignant neoplasms. The study enrollment criteria were: the presence of an inform consent for the study conduction, patient's age from 15 to 70 years, confirmed diagnosis of OC.

The main group OC patients exposed to IR and control group OC patients unexposed to IR were standardized by age at the moment of diagnosis ($p = 0.45$). The mean age for the main group patients was (51.5 ± 9.0) years, and for the control group patients – (51.7 ± 10.2) years. Distribution of OC patients by the age at the moment of diagnosis is shown in Table 1.

The research material for the main group patients was archival ovarian tissue samples, for the control group patients – peripheral blood samples that were sent from 22 Ukrainian medical institutions where the patients were treated.

Таблиця 1

Розподіл хворих на РЯ за віком на час встановлення діагнозу

Table 1

Distribution of OC patients by the age at the moment of diagnosis

Вік, роки Age, years	Кількість пацієнтів / Number of patients			
	Основна група з РЯ / Main group with OC (n = 38)		Контрольна група з РЯ / Control group with OC (n = 268)	
	абс. кількість / number	%	абс. кількість / number	%
До 35 / Up to 35	2	5,3	20	7,5
36–40	3	7,9	19	7,1
41–45	3	7,9	27	10,1
46–50	10	26,3	47	17,5
51–55	7	18,4	51	19,0
56–60	7	18,4	44	16,4
61–65	4	10,5	42	15,7
66–70	2	5,3	18	6,7

Геномну ДНК екстрагували з фіксованих формаліном і залитих парафіном тканин з використанням набору для виділення ДНК Quiamp DNA Mini Kit (Quiagen, Hilden, Німеччина), а також виділяли зі зразків периферичної крові з використанням набору NeoPrep100 DNA Magnet (Neogene, Україна) відповідно до інструкції виробників. Визначення досліджуваних мутацій проводили за допомогою алель-специфічної мультиплексної полімеразної реакції (ПЛР) на термоциклері Gene-Amp PCR 2400 (Roche Diagnostic Systems, США) і реагентів PCR MIX 2x HOT (Neogene, Україна). Ампліфікація включала початкову денатурацію – 95 °С, 10 хв; 35 циклів денатурації – 95 °С, 45 с; реасоціації – 57 °С 45 с; синтезу – 72 °С, 50 с; і фінальний синтез – 72 °С, 8 хв. ПЛР зупиняли охолодженням реакційної суміші до 4 °С. Продукти ПЛР для візуалізації розділяли відповідно до молекулярної ваги за допомогою електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі з фарбуванням бромистим етидієм. Гель візуалізували збудженням флуоресценції бромистого етидію за ультрафіолетового випромінювання довжиною хвилі 312 нм і фотографували відеосистемою BioVision (Франція).

Усім 306 пацієнткам проводили молекулярно-генетичний аналіз на наявність мутацій 5382insC і 185delAG у гені *BRCA1* та мутації 6174delT у гені *BRCA2* методом алель-специфічної мультиплексної ПЛР з подальшим гель-електрофорезом продуктів ампліфікації (рис. 1).

Параметричні показники порівнювали за допомогою *t*-критерію Стьюдента. Непараметричні дані оцінювали з використанням точного тесту Фішера в двобічному варіанті. Статистичні розрахунки виконували за допомогою Microsoft Excel 2016 та Social Science Statistics calculator. Твердження про наявність істотних розбіжностей припускали за вірогідності помилки менше 0,05.

Genomic DNA was extracted from the formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) OC tissue samples using Quiamp DNA Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany), and from the peripheral blood samples using NeoPrep100 DNA Magnet Kit (Neogene, Ukraine) in accordance with the manufactures instructions. The detection of the studied mutations was performed by allele specific polymerase chain reaction (PCR) using a thermocycler Gene-Amp PCR 2400 (Roche Diagnostic Systems, USA) and reagents PCR MIX 2x HOT (Neogene, Ukraine). The amplification included the initial denaturation at 95 °C for 10 min, 35 denaturation cycles at 95 °C for 45 s, reoccupation at 57 °C for 45 s, synthesis at 72 °C for 50 s, and final synthesis at 72 °C for 8 min. PCR was stopped by the cooling of the reaction mixture to 4 °C. PCR products were separated for visualization according to molecular weight by electrophoresis in a 1.5 % agarose gel with ethidium bromide. The gel was visualized by excitation of the ethidium bromide fluorescence using ultraviolet radiation with 312 nm wavelength, then the gel was photographed using a video system BioVision (France).

The detection of *BRCA1* 5382insC and 185delAG and *BRCA2* 6174delT mutations was performed for all 308 patients using the allele specific multiplex PCR with further gel electrophoresis of the PCR products (Fig. 1).

Parametric variables were compared by Student's *t*-test. Nonparametric variables were evaluated using exact Fisher's test in two-way version. Statistical calculations were performed using Microsoft Excel 2016 and Social Science Statistics calculator. The presence of significant differences was assumed by the probability of a mistake less than 0.05.

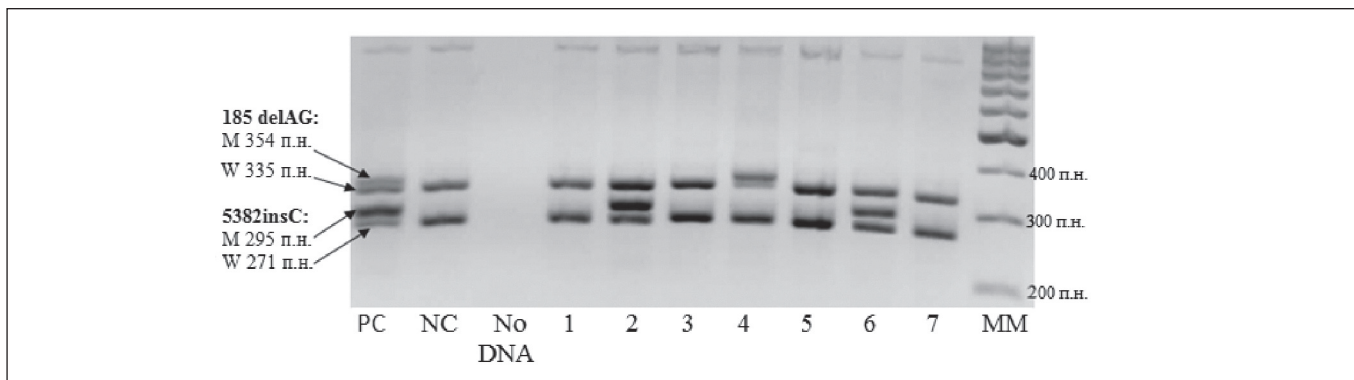


Рисунок 1. Електрофореграма детекції мутацій 185delAG та 5382insC гену BRCA1

Бенд, позначений W, відповідає алелі дикого типу (W – wild-type product), наявність бенду М є ознакою наявності досліджуваних мутацій (М – mutant product); PC – позитивний контроль; NC – негативний контроль; No DNA – відсутність матриці ДНК, MM – маркер молекулярної ваги; 1–7 – зразки, що вивчались. Доріжки 2, 4, 6 – випадки з мутацією; 2, 4 – 5382insC, 4 – 185delAG; доріжки 1, 3, 5, 7 – випадки без мутацій.

Figure 1. Electrophoregram of the BRCA1 185delAG and 5382insC mutations detection

W – wild-type product; M – mutant product; PC – positive control; NC – negative control; No DNA – absence of DNA template; MM – molecular weight marker; 1–7 – studied samples. Bands 2, 4, 6 – mutated samples: 2, 4 – 5382insC, 4 – 185delAG; bands 1, 3, 5, 7 – wild type samples.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Успішна ампліфікація ДНК в когорті жінок з радіаційним анамнезом була досягнута для 86,8 % (33 із 38), 92,1 % (35 із 38) та 100 % (38 із 38) випадків для 185delAG, 5382insC та 6174delT, відповідно. У зазначеній групі ДНК для проведення ПЛР було виділено з архівних парафінових блоків тканини, фіксованої формаліном, тому визначення статусу генів BRCA1/2 вдалося здійснити не в усіх випадках. У когорті хворих на РЯ без радіаційного анамнезу ампліфіковано всі досліджувані алелі в генах BRCA1/2. Випадки, щодо яких, принаймні для однієї з мутацій, було досягнуто успішну ампліфікацію, включали в подальший аналіз і розрахунок загальних частот мутацій.

За результатами молекулярно-генетичного аналізу встановлено, що частота мутацій у хворих на РЯ основної групи склала 5,3 % (2 з 38 випадків). У хворих контрольної групи виявлено 11,2 % (30 з 268) випадків з мутацією. Результати проведених молекулярно-генетичних досліджень у випадках з успішною ампліфікацією ділянок генів BRCA1/2 відображені у табл. 2.

RESULTS AND DISCUSSION

The successful DNA amplification in the main IR-exposed group was obtained in 86.8 % (33 from 38), 92.1 % (35 from 38) and 100 % (38 from 38) of cases for 185delAG, 5382insC and 6174delT variants, respectively. To perform PCR we used FFPE OC tissue samples from the patients exposed to IR, thus the mutational BRCA1/2 status was not identified for all cases. In the cohort of unexposed OC patients all studied BRCA1/2 alleles were amplified. Cases with the successful DNA amplification at least for one mutation were included into further analysis and calculation of common mutation frequencies.

According to the molecular genetic analysis results it was found that the frequency of the mutations in the main group OC patients was 5.3 % (2 out of 38) cases. Among the control group patients 11.2 % (30 out of 268) cases were detected with mutation. The results of performed molecular genetic analysis with successful BRCA1/2 gene fragments amplification are shown in the Table 2.

Таблиця 2

Частота мутацій у генах BRCA1/2 з урахуванням успішної ампліфікації

Table 2

Frequency of BRCA1/2 mutations with successful amplification

Мутації / Mutations	Основна група з РЯ Main group with OC	Контрольна група з РЯ Control group with OC	Всі пацієнти All patients
BRCA1 185delAG	0 з/з 33	4 з/з 268 (1,5 %)	4 з/з 301 (1,3 %)
BRCA1 5382insC	2 з/з 36 (5,5 %)	26 з/з 268 (9,7 %)	28 з/з 304 (9,2 %)
BRCA2 6174delT	0 з/з 38	0 з/з 268	0 з 306

Дані, наведені в таблиці, свідчать, що мутація 5382insC у гені *BRCA1* домінує серед інших мутацій ($p < 0,001$) і становить 87,5 % (28 з 32 випадків з мутацією), натомість алельний варіант 6174delT гена *BRCA2* не виявлено у жодної пацієнтки з обох груп.

Встановлено, що частота мутацій *BRCA1/2* у хворих на РЯ жінок з радіаційним анамнезом та без такого, з урахуванням тільки випадків з успішною ампліфікацією, загалом склала 10,4% (32 із 306), значущої різниці за частотою мутацій між групами хворих виявлено не було ($p = 0,39$).

Середній вік *BRCA*-позитивних хворих на РЯ з радіаційним анамнезом становив 40,5 (35–46) років, без радіаційного анамнезу – 50,4 (30–65) років. Виявлено тенденцію до більш раннього віку захворювання на РЯ серед осіб основної когорти з мутаціями порівняно з *BRCA*-позитивними особами контрольної групи ($p = 0,06$). У *BRCA*-негативних хворих, які постраждали внаслідок аварії на ЧАЕС, та без радіаційного анамнезу, середній вік не відрізнявся ($p = 0,48$) і становив 52,0 роки (95 % ДІ 49,1–54,8) та 51,9 року (95 % ДІ 51,6–53,2), відповідно. Медіана віку у *BRCA*-негативних осіб основної групи склала 52,5 року (від 31 до 67), контрольної – 53,0 роки (від 15 до 70). При порівнянні хворих з *BRCA*-позитивним РЯ та *BRCA*-негативним РЯ основної когорти встановлено статистичну значущість щодо маніфестації захворювання у пацієнтів з мутаціями у більш ранньому віці ($p = 0,04$). Проте таких відмінностей не спостерігалось в контрольній групі ($p = 0,22$).

Встановлено вікову залежність між дією ІР внаслідок аварії на ЧАЕС та маніфестацією РЯ ($r = 0,97$) (рис. 2).

The data shown in the Table 2 indicate that *BRCA1* 5382insC mutation is prevalent among other mutations ($p < 0.001$) and present in 87.5 % (28 from 32) of cases. Whereas, *BRCA2* 6174delT allelic variant was not identified in any patient among both groups.

It was found that overall the frequency of *BRCA1/2* gene mutations in exposed to IR and unexposed patients with OC, taking into account only samples with successful DNA amplification, was 10.4 % (32 from 306). There was no significant difference in the frequency of mutations between these groups of patients ($p = 0,39$).

The mean age of the *BRCA1*-positive exposed to IR patients with OC was 40.5 (35–46), and unexposed to IR patients – 50.4 (30–65) years. There was a tendency toward an earlier age of the OC manifestation in the main group individuals with mutations compared *BRCA*-positive women of the control group ($p = 0.06$). Among *BRCA*-negative patients who were exposed to IR due to Chernobyl nuclear accident and unexposed the mean age did not differ ($p = 0.48$) and was 52.0 (95 % CI: 49.1–54.8) and 51.9 (95 % CI: 51.6–53.2), respectively. The median age of the *BRCA*-negative women in the main group was 52,5 (from 31 to 67) years, in the control group – 53.0 (from 15 to 70) years. When comparing *BRCA*-positive and *BRCA*-negative patients with OC of the main cohort, the statistical significance was shown for the disease manifestation at the earlier age among positive for the mutations women ($p = 0.04$). However, such difference was not observed in the control group ($p = 0.22$).

In the study we showed a correlation between the age at the time of exposure to IR due to Chernobyl nuclear accident and OC manifestation ($r = 0.97$) (Fig. 2).

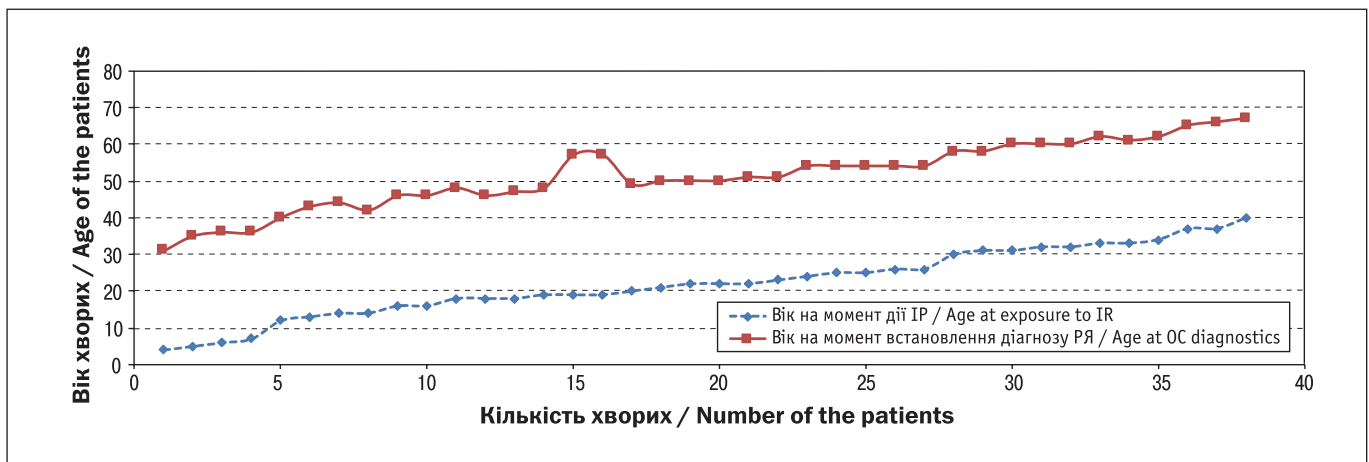


Рисунок 2. Діаграма вікової кореляції на момент дії ІР та маніфестації діагнозу РЯ

Figure 2. Chart of age correlation between the age at the time of exposure to IR and OC manifestation

Захворюваність на РЯ в основній групі спостерігалась тільки через 27–38 років після моменту впливу чинників Чорнобильської катастрофи у когорті жінок, яким на момент аварії було від 4 до 40 років.

Отже, у даному дослідженні встановлена частота найпоширеніших в Україні мутацій у генах *BRCA1/2* серед 306 хворих на РЯ, зокрема у жінок, які зазнали впливу чинників Чорнобильської катастрофи. Існують гіпотези, що канцерогенна дія ІР реалізується переважно у хворих, які народжуються зі спадково-зумовленим ризиком онкологічного захворювання. *BRCA1/2*-позитивні жінки характеризуються вищим ризиком захворювання на РЯ [4]. Спадкове порушення системи репарації ДНК може сприяти формуванню пухлинного генотипу і пошкодження ДНК при дії ІР. Тому імовірним було частіше представлення *BRCA1/2*-позитивних випадків РЯ у жінок з радіаційним анамнезом. Проте в когорті хворих на РЯ з радіаційним анамнезом поширеність мутацій склала 5,3 %, а в групі пацієнтів без радіаційного анамнезу 11,2 % ($p = 0,39$). На нашу думку, така низька поширеність в основній когорті хворих пов'язана з тим, що, поперше, в дану групу увійшли тільки 3 жінки, які були учасницями ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС, та 2 евакуйовані з 30-км зони особи. Це жінки, які отримали найбільшу дозу опромінення, порівняно з 33 пацієнтками, які проживають в контрольованих зонах. По-друге, можливо це пов'язано з невдалою ампліфікацією частини досліджуваних алелів. Неампліфікованими в даній когорті хворих залишились 13,2 % (5 із 38) зразків за алелем 185delAG і 7,9 % (3 із 38) за алелем 5382insC, на долю якого припадає більшість від усіх випадків мутацій в гені *BRCA1* [6, 12, 13]. По-третє, ефект підвищеної радіочутливості у пацієнтів з мутаціями міг спровокувати розвиток *BRCA1/2*-залежних злоякісних новоутворень у більш ранньому віці [12] і призвести до смерті. Так, у носіїв мутацій будь-який вплив опромінення у віці до 30 років пов'язаний з підвищеним ризиком раку молочної залози у дозах, значно нижчих, ніж в інших когортах, що зазнали впливу радіації [14]. З цієї причини такі хворі могли не потрапити до когорти дослідження.

Загалом, частота мутацій в обох когортах дослідження серед невідібраних за сімейним анамнезом хворих на РЯ склала 10,4 %. Враховуючи той факт, що не було проаналізовано весь ген *BRCA1* та ген *BRCA2*, ця частота є недооціненою. Частота мутацій залежить від спектру досліджуваних мутацій в генах *BRCA1/2*, від ступеня ампліфікації ДНК і

The incidence of OC after the Chornobyl accident was observed 27–38 years later in a cohort of women who were from 4 to 40 years old at the moment of the nuclear explosion.

Thus, in this study, the frequency of the most common in Ukraine *BRCA1/2* gene mutations was determined in 306 patients with OC, particularly in exposed to IR due to Chornobyl disaster women. There are hypotheses that the carcinogenic effect of IR is realized to a greater extent in patients who are born with a hereditary risk of oncological disease. *BRCA1/2*-positive women are at a higher risk of OC development [4]. Inherited disorder of the DNA repair system might contribute to the tumor genotype formation and DNA damage when exposed to IR. Therefore, a higher rate of *BRCA1/2*-positive cases of OC in women with radiation history was predicted. However, in the cohort of OC patients exposed to IR the mutation frequency was 5.3 %, and in the cohort of unexposed patients 11.2 % ($p = 0.39$). In our opinion, such a low prevalence of the mutations in the main cohort of patients may be due to the fact that: firstly, in the study were enrolled only three women, follow-up workers of the accident consequences, and two evacuated women from 30 km zone. These women had received the highest dose of IR compared to 33 individuals who are residents of the control zones. Secondly, it may be related to the unsuccessful amplification of the part of the studied alleles. The PCR amplification was unsuccessful for 13.2 % (5 out of 38) of cases for 185delAG allele and 7.9 % (3 out of 38) of cases for 5382insC allele in this cohort of patients. Moreover, 5382insC is the most frequent *BRCA1* gene [6, 12, 13]. Thirdly, the effect of higher radiosensitivity in positive for the mutations patients could provoke the development of *BRCA1/2*-dependent malignant neoplasms at earlier age [12] and lead to a death. Thus, any exposure to IR for the mutation carriers under the age of 30 years is associated with an increased risk of breast cancer at the significantly lower doses than for other cohorts that have been exposed to IR [14]. For this reason, these patients could not be included into the study cohorts.

Overall, among unselected by family history patients with OC the frequency of the mutations in both study cohorts was 10.4 %. Taking into account the fact that whole lengths of *BRCA1* and *BRCA2* genes have not been analyzed, this frequency is underestimated. The frequency of the mutations depends on a spectrum of the of studied *BRCA1/2* gene mutations, level of DNA

чисельності вибірки. Так, у попередньому нашому дослідженні, де досліджувалося 5 мутацій в генах *BRCA1/2* серед пацієнтів з РЯ, частота мутацій була більшою і склала 12,8 % (у 32 з 249 жінок) [6].

Серед досліджуваного спектру мутацій встановлено, що патологічний алель 5382insC у гені *BRCA1* є домінуючим, що спостерігається і в різних країнах Європи [12, 13]. Натомість алельний варіант 6174delT гена *BRCA2* не виявлено у жодної пацієнтки з двох груп.

Реалізація розвитку РЯ через дію радіаційного фактора у *BRCA1*-позитивних осіб нашого дослідження відбулася у більш ранньому віці, ніж у пацієнтів без мутацій ($p = 0,04$). Знайдено позитивний кореляційний зв'язок ($r = 0,97$) між віком на момент дії ІР внаслідок аварії на ЧАЕС і віком маніфестації РЯ.

ВИСНОВКИ

1. Частота мутацій у хворих на РЯ з радіаційним анамнезом та без такого не відрізняється і залежить від спектру досліджуваних мутацій в генах *BRCA1/2*, від ступеня ампліфікації ДНК та чисельності вибірки.
2. Алельний варіант 5382insC у гені *BRCA1* є домінуючим і становить 87,5 % у спектрі досліджуваних мутацій.
3. Через дію радіаційного фактора захворювання на РЯ у *BRCA1*-позитивних осіб реалізується у більш ранньому віці, ніж у пацієнтів без мутацій.
4. Захворюваність на РЯ спостерігалась через 27–38 років після Чорнобильської катастрофи у когорті жінок, яким на момент аварії було від 4 до 40 років.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Рак в Україні, 2016-2017: захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби / З. П. Федоренко, Л. О. Гулак, Ю. Й. Михайлович та ін. Бюлетень Національного канцер-реєстру України. 2018. № 19. URL: http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_19/index.htm.
2. Prevalence and penetrance of germline *BRCA1* and *BRCA2* mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer / H. A. Risch, J. R. McLaughlin, D. E. Cole et al. *Am. J. Hum. Genet.* 2001. Vol. 68, no 3. P. 700–710. DOI: 10.1086/318787.
3. Frequencies of *BRCA1* and *BRCA2* mutations among 1,342 unselected patients with invasive ovarian cancer / S. Zhang, R. Royer, S. Li et al. *Gynecol. Oncol.* 2011. Vol. 121. P. 353–357. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.01.020>.
4. Average risk 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 / A. Antoniou, P.D. Pharoah, S.

amplification and sample number. Thus, our previous research studied five *BRCA1/2* gene mutations and demonstrated a higher frequency of the mutations 12.8 % (in 32 out of 249 women) [6].

Among the analyzed mutational spectrum it was found that the pathogenic allelic variant *BRCA1* 5382insC is prevalent, what is observed in different countries of Europe. [12, 13]. Whereas, the allelic variant *BRCA2* 6174delT was not detected in any patient of the main or control group.

In our study the OC manifestation related to IR in *BRCA1*-positive subjects happened at an earlier age than in patients negative for the mutations ($p = 0.04$). There was a positive correlation ($r = 0.97$) between the age at the time of exposure to IR due to Chernobyl nuclear accident and OC manifestation.

CONCLUSIONS

1. The frequency of the mutations in exposed to IR and unexposed patients with OC does not differ and depends on a spectrum of studied *BRCA1/2* gene mutations, level of DNA amplification and sample number.
2. The allelic variant *BRCA1* 5382insC is dominant and accounts for 87.5 % of the total number of the found mutations.
3. Due to the radiation factor the OC in the *BRCA1*-positive individuals is realized at the earlier age than in patients negative for these mutations.
4. The incidence of OC after the Chernobyl accident was observed 27–38 years later in a cohort of women who were from 4 to 40 years old at the moment of the nuclear explosion.

REFERENCES

1. Fedorenko ZP, Gulak LO, Mykhailovych Yul, Gorokh YeL, Ryzhov AYU, Sumkina OV, Kutsenko LB. [Cancer in Ukraine, 2016-2017: morbidity, mortality, performance indicators of cancer services] [Internet]. Bulletin of National Cancer Registry of Ukraine. 2018;(19). Available from:http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_19/index.htm. Ukrainian.
2. Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, Rosen B, Bradley L, Kwan E, et al. Prevalence and penetrance of germline *BRCA1* and *BRCA2* mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet.* 2001;68(3):700-10. DOI: 10.1086/318787.
3. Zhang S, Royer R, Li S, McLaughlin JR, Rosen B, Risch HA, et al. Frequencies of *BRCA1* and *BRCA2* mutations among 1,342 unselected patients with invasive ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2011;121:353-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.01.020>.

- Narodetal. *Am. J. Hum. Genet.* 2003. Vol.72. P. 1117–1130. DOI:https://doi.org/10.1086/375033.
5. Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (review) / H. Kobavashi, S. Ohno, Y. Sasaki, M. Matsuura. *Oncol. Rep.* 2013. Vol. 30, no. 3. P. 1019–1029. DOI: https://doi.org/10.3892/or.2013.2541.
 6. Rybchenko L. Ovarian cancer and mutationfl status of *BRCA1* and *BRCA2* genes / L. Rybchenko, L. Poluben, H. Vychkova et al. *Науково-практична конференція молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», 4-5 лютого 2019 р., Київ, Україна. Онкологія*, 2019. Т. 21, № 1. P. 80.
 7. Роль генетичних факторів у схильності до розвитку первинно-множинних пухлин органів жіночої репродуктивної системи / О. В. Палийчук, Л. З. Поліщук, Н. Г. Горовенко та ін. *Клин. онкол.* 2013. Т. 2, № 10. С. 83–89.
 8. Высокая частота мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *NBN*, *BLM* у больных раком яичников в российской популяции / Е. И. Батенева, М. Г. Филиппова, А. С. Тюляндина и др. *Опухоли женской репродуктивной системы.* 2014. Т. 4. С. 51–56.
 9. The prevalence of *BRCA1* mutations among families at high-risk of breast and ovarian cancer in province of Malopolska between 2004-2009/ P. Blecharz, W. Szatkowski, M. Klimek et al. *Przegl Lek.* 2009. Vol. 66, № 12. P. 1046–1048.
 10. The contribution of founder mutations in *BRCA1* to breast and ovarian cancer in Lithuania / P. Elsakov, J. Kurtinaitis, S. Petraitis et al. *Clin. Genet.* 2010. Vol. 78, no 4. P. 373–376. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01404.x.
 11. Аналіз частоти найбільш поширених мутацій генів *BRCA1* та *BRCA2* у жінок, які приймали участь у ліквідації наслідків Чорнобильської катастрофи / Л. А. Рибченко, Г. М. Бичкова, С. В. Клименко та ін. *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології.* 2012. Вип.17. С. 267–273.
 12. Increased chromosomal radiosensitivity in asymptomatic carriers of a heterozygous *BRCA1* mutation/ A. Baert, J. Depuydt, T. V. Maerkenet et al. *Breast Cancer Res.* 2016. Vol. 18, No 1. P. 52. DOI: 10.1186/s13058-016-0709-1.
 13. Janavicius R. Founder *BRCA1/2* mutations in the Europe: implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control. *EPMA J.* 2010. Vol. 1. P. 397–412. DOI: 10.1007/s13167-010-0037-y.
 14. Exposure to diagnostic radiation and risk of breast cancer among carriers of *BRCA1/2* mutations: retrospective cohort study (GENE-RAD-RISK)/ A. Pijpe, N. Andrieu, D.F. Easton et al. *BMJ.* 2012. Vol. 345. P. e5660. DOI: 10.1136/bmj.e5660.
 4. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average risk 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. DOI:https://doi.org/10.1086/375033.
 5. Kobavashi H, Ohno S, Sasaki Y, Matsuura M. Hereditary breast and ovarian cancersusceptibility genes (review). *Oncol Rep.* 2013;30(3):1019-29. DOI: https://doi.org/10.3892/or.2013.2541.
 6. Rybchenko L,Poluben L, Bychkova H, et al. Ovarian cancer and mutationfl status of *BRCA1* and *BRCA2* genes. *Oncology (Ukraine).* 2019;21(1):80.
 7. Paliychuk OV, Polischuk LZ, Gorovenko NG, et al. [The role of genetic factors in the propensity to develop primary and multiple tumors of the organs of the female reproductive system]. *Clinical Oncology.* 2013;2(10):83-9. Ukrainian.
 8. Bateneva EI, Filippova MG, Tylyantina AC, et al. [High frequency of mutations in the *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *NBN*, *BLM* genes in patients with ovarian cancer in the Russian population]. *In: Tumors of the female reproductive system.* 2014. Vol. 4. p. 51-6. Russian.
 9. Blecharz P, Szatkowski W, Klimek M, Urbanski K. [The prevalence of *BRCA1* mutations among families at high-risk of breast and ovarian cancer in province of Malopolska between 2004-2009]. *Przegl Lek.* 2009;66(12):1046-8. Polish.
 10. Elsakov P., Kurtinaitis J., Petraitis S, Ostapenko V, Razumas M, Razumas T, et al. The contribution of founder mutations in *BRCA1* to breast and ovarian cancer in Lithuania. *Clin Genet.* 2010;78(4): 373-6. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01404.x.
 11. RybchenkoLA, BychkovaAM, SkybanGV, YaroshenkoNE, Klymenko SV. [The frequency analysis of the most common mutations in genes *BRCA1* and *BRCA2* in women, which took part in the liquidation of Chernobyl disaster consequences]. *Probl Radiac Med Radiobiol.* 2012;17:267-73.Ukrainian.
 12. Baert A, Depuydt J, Maerkenet TV, Poppe B, Malfait F, Storm K, et al. Increased chromosomal radiosensitivity in asymptomatic carriers of a heterozygous *BRCA1* mutation. *Breast Cancer Res.* 2016;18(1):52. DOI: 10.1186/s13058-016-0709-1.
 13. Janavicius R. Founder *BRCA1/2* mutations in the Europe: implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control. *EPMA J.* 2010;1(3):397-412.DOI: 10.1007/s13167-010-0037-y.
 14. Pijpe A, Andrieu N, Easton DF, Kesminiene A, Cardis E, Nogués C, et al. Exposure to diagnostic radiation and risk of breast cancer among carriers of *BRCA1/2* mutations: retrospective cohort study (GENE-RAD-RISK). *BMJ.* 2012;345:e5660. DOI: 10.1136/bmj.e5660.

ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

Рибченко Людмила Анатоліївна – кандидат медичних наук, старший науковий співробітник лабораторії мутагенезу та антимутагенезу, Інститут експериментальної радіології ННЦРМ, м. Київ

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Lyudmila A. Rybchenko – Candidate of Medical Sciences, Researcher of the Laboratory of Mutagenesis and Antimutagenesis, Institute of Experimental Radiology, NRCRM, Kyiv, Ukraine

Полубень Лариса Олександрівна – кандидат медичних наук, молодший науковий співробітник лабораторії медико-генетичного консультування, Інститут експериментальної радіології, ННЦРМ, м. Київ

Бичкова Ганна Марківна – кандидат медичних наук, завідувач лабораторії медико-генетичного консультування, Інститут експериментальної радіології, ННЦРМ, м. Київ

Стефанович Ганна Володимирівна – кандидат медичних наук, провідний науковий співробітник лабораторії медико-генетичного консультування, Інститут експериментальної радіології, ННЦРМ, м. Київ

Клименко Сергій Вікторович – доктор медичних наук, професор, завідувач відділу медичної генетики Інституту експериментальної радіології ННЦРМ, професор кафедри внутрішньої медицини № 1 Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, м. Київ

Larysa O. Poluben – Candidate of Medical Sciences, Junior Researcher of the Laboratory of Medical Genetic Counseling, Institute of Experimental Radiology, NRCRM, Kyiv, Ukraine

Ganna M. Bychkova – Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Medical Genetic Counseling, Institute of Experimental Radiology, NRCRM, Kyiv, Ukraine

Anna V. Stephanovych – Candidate of Medical Sciences, Leading Researcher of the Laboratory of Medical Genetic Counseling, Institute of Experimental Radiology, NRCRM, Kyiv, Ukraine

Serhii V. Klymenko – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Medical Genetics, Experimental Radiology Institute, NRCRM, Professor of the Department of Internal Medicine №1, Bogomolets National Medical University, Kyiv

Стаття надійшла до редакції 21.05.2019

Received: 21.05.2019