

**ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ BRCA1 И BRCA2 –
ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ПРОВЕДЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО СКРИНИНГА**
**IDENTIFICATION OF MUTATIONS IN BRCA1 AND BRCA2 GENES-
THE POTENTIAL FOR GENETIC SCREENING**

C. Д. Бруякин¹, Е. Е. Тарасова¹, И. В. Суворова²
S. Bruyakin¹, E. Tarasova¹, I. Suvorova²

¹*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь*

²*ИООО «Синэво», г. Минск, Республика Беларусь
bruyakin.sergey@gmail.com*

¹*Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus*
²*«Synevo» LLC, Minsk, Republic of Belarus*

От 5% до 10% всех случаев рака молочной железы (далее – РМЖ) имеют генетическую предрасположенность. 80–90% случаев наследственного рака молочной железы (далее – НРМЖ) являются результатом мутаций, затрагивающих гены: Breast Cancer1/2 (далее – BRCA1/2). Исследования в области молекулярной генетики позволяют идентифицировать носителей мутантных аллелей, что крайне важно для эффективного лечения и профилактики РМЖ.

Between 5% and 10% of all cases of breast cancer (BC) have a genetic predisposition. 80–90% of cases of hereditary breast cancer (HBC) are the result of mutations affecting the genes: Breast cancer1/2 (BRCA1/2). Research in the field of molecular genetics allows the identification of carriers of mutant alleles, which is extremely important for effective treatment and prevention of BC.

Ключевые слова: молочная железа, рак молочной железы, BRCA1, BRCA2, мастэктомия, трижды негативный рак, гомологичная рекомбинация (далее – HR).

Keywords: mammary gland, breast cancer, BRCA1, BRCA2, mastectomy, thrice negative cancer, homologous recombination (HR).

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-208-211>

По данным ВОЗ РМЖ является наиболее распространенным онкологическим заболеванием среди женщин. У мужчин РМЖ встречается в 100 раз реже.

Выделяют 2 формы РМЖ: наследственную и спорадическую. Патологические аллели BRCA1/2 определяют наследственную предрасположенность к РМЖ.

НРМЖ имеет ряд особенностей, отличающих его от спорадической формы: более молодой возраст прогрессирования заболевания, высокий риск развития рака контралатеральной молочной железы (далее – РКМЖ), особая гистологическая картина – до 80% случаев эта форма рака представлена трижды негативным раком (THP) с высоким пролиферативным индексом и III степенью злокачественности.

Мутации в генах BRCA1/2 более чем в 5 раз увеличивают риск развития РМЖ. Согласно некоторым данным, к 70 годам кумулятивный риск развития РМЖ у женщин, являющихся носителями патологических аллелей гена BRCA1, находится в пределах 57–65%, при этом риск развития рака яичников (далее – РЯ) составляет 39–40%. При обнаружении мутации в гене BRCA2 вероятность развития РМЖ составляет 45–49%, для РЯ – 11–18%. Другими формами рака, имеющими повышенный риск развития при мутации BRCA1/2, являются: рак поджелудочной железы (до 2%), рак желудка и рак головы и шеи [1].

Своевременный генетический скрининг позволяет предотвратить развитие РМЖ или подобрать наиболее эффективное лечение в случаях уже доказанного наличия опухоли, нельзя не отметить важность знания BRCA1/2 статусов партнеров при планировании семьи.

Ген BRCA1 находится на длинном плече 17-й хромосомы (17q21) содержит 22 кодирующих экзона и 2 не кодирующих экзона, а соответствующий белок состоит из 1863 аминокислот. Ген BRCA2 расположен на 13-й хромосоме (13q12.3) состоит из 26 кодирующих экзонов, 1 не кодирующего экзона, 26 инtronов и кодирует белок из 2329 аминокислот. Для генов BRCA1/2 характерен аутосомно-домinantный тип наследования с неполной пенетрантностью.

Молекулярная структура генов BRCA1/2 очень нестабильна и вариабельна. Возможно это связано с наличием повторяющихся фрагментов в генах BRCA1/2 (47 % в BRCA1 и 42 % в BRCA2, в основном представленных за счет Alu-повторов). Также полагают, что некоторые участки белкового продукта гена BRCA1 имеют незначительную структурную консервативность, и аминокислотные замены внутри них не оказывают влияния

на функциональную активность белка. В то же время имеются высококонсервативные участки, например RING и BRCT домены. Миссенс-варианты внутри этих доменов в большей степени ассоциированы с предрасположенностью к РМЖ, по сравнению с мутациями, расположенными в других участках.

Несмотря на то, что мутации генов BRCA1/2 чрезвычайно многообразны, при обследовании населения в разных странах часто можно проследить т.н. «эффект основателя», заключающийся в преобладании каких-либо конкретных мутаций BRCA1/2 в данной популяции, что значительно упрощает проведение масштабного генетического скрининга.

Белки BRCA1/2 играют разные роли в HR двунитевых разрывов ДНК (DSB) (рис.). BRCA1 действует на ранней стадии HR путем противодействия ингибитору резекции p53, и на более поздней стадии, взаимодействуя с белком PALB2 который способствует закреплению BRCA2 на хроматине. Комплекс BRCA1-C увеличивает количество репликативного протеина A (RPA) в участке повреждения. Данный протеин препятствует полимеризации и скручиванию одноцепочечной ДНК, позволяя ей оставаться в неспаренном развернутом состоянии. Позже RPA заменяется на белок RAD51. Комплекс BRCA1-A отвечает за супрессию избыточной HR путем ограничения доступа BRCA1 и некоторых других белков к очагу повреждения. BRCA2 способствует связыванию рекомбиназы RAD51 с продуктом резекции в результате чего образуется нить RAD51-ssDNA, которая важна для HR и предотвращает вовлечение 3'-ssDNA в путь вредного однонитевого отжига (SSA). SSA действует, когда присутствуют гомологичные повторы, и приводит к удалению последовательностей между повторами [2].

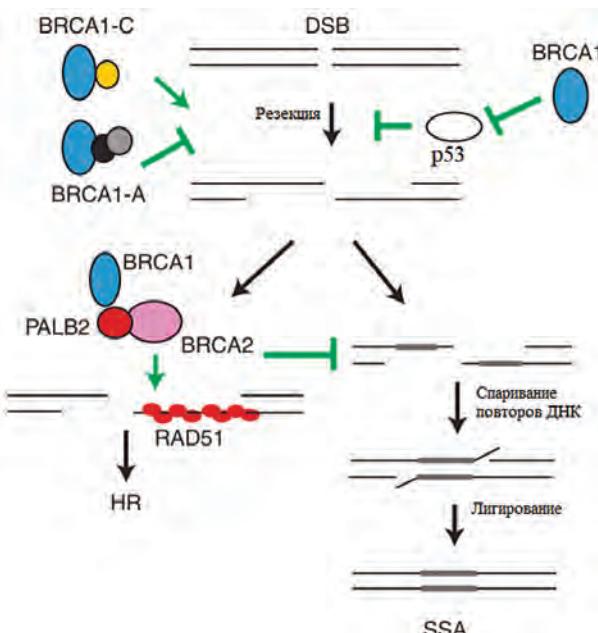


Рисунок – Механизм BRCA1/2 зависимой репарации ДНК

Поскольку эстрогены стимулируют пролиферацию клеток, повышенное воздействие эстрогенов увеличивает риск развития случайных генетических ошибок. В процессе метаболизма образуются активные формы кислорода, что вызывает окислительное повреждение ДНК. Длительное воздействие эстрогена тесно связано с повышенным риском развития РМЖ. Эстрогены связываются главным образом с рецепторами эстрогена (далее – ER), которые, как полагают, опосредуют различные эффекты эстрогенов. С другой стороны, передача сигналов андрогенами может вызывать апоптоз, активируя реакцию повреждения ДНК. BRCA1 регулирует экспрессию ER в зависимости от фактора транскрипции (далее – OCT1). Стимуляция эстрогенами увеличивает экспрессию BRCA1 посредством активации транскрипции генов ER с участием транскрипционного ко-активатора, p300. Кроме того, белок BRCA1 может негативно регулировать ER-опосредованную трансактивацию нижестоящих генов. Недавние исследования показали связь между дефицитом репарации ДНК и снижением концентрации эстрогена, а также андрогенных рецепторов. Кроме того, эстрогены не только необходимы для роста и дифференцировки молочных желез, но также усиливают активность белка-супрессора опухолей p53. Считается, что наличие в опухоли ER является благоприятным прогностическим признаком и свидетельствует о чувствительности опухоли к регуляторному воздействию экзогенных гормонов.

Опухоли, возникающие у носителей мутаций BRCA1 и BRCA2, имеют характерные патологические особенности. Рак, возникающий среди носителей BRCA1, чаще классифицируется как медуллярный и характеризуется более высоким митотическим индексом, чем спорадические формы. Опухоли, возникающие у носителей BRCA1, имеют тенденцию испытывать недостаток в рецепторах прогестерона (далее – PR), ER и второго рецептора фактора роста (далее – HER2) и, следовательно, демонстрируют «тройной отрицательный» фенотип. Большинство опухолей BRCA1 экспрессируют базальные цитокератины. РМЖ, возникающий у носителей мутации BRCA2, как правило, более гетерогенный, чем у носителей мутации BRCA1. Он демонстрирует более высокую степень

злокачественности, чем спорадические опухоли. Опухоли BRCA2 менее склонны к избыточной экспрессии HER2 по сравнению со спорадическими опухолями [3].

Согласно данным ФГБУ «Российского научного центра рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения России: при патоморфологическом исследовании операционного материала пациентов, проходивших лечение в период с 2010 по 2016 гг. у 86% пациентов выявлен инфильтративный протоковый рак, у 4,7% пациентов выявлен инфильтративный дольковый рак. Преобладала II–III степень злокачественности в 41,9% и 39,5% случаях соответственно. Выявлено 27% пациентов с BRCA1/2 дефицитным, ТНР молочной железы. При патоморфологическом исследовании профилактически удаленных контраполатеральных молочных желез наблюдалась следующая картина: морфологическая картина фиброзно-кистозной болезни, внутрипротоковые папилломы, в 2-х случаях имелась атипическая протоковая гиперплазия 2 степени. Раковых клеток ни в одном случае выявлено не было [4].

Наиболее популярным методом для определения мутантных аллелей BRCA1/2 является ПЦР-в режиме реального времени. Внедрение этого метода в лабораторную практику позволило полностью отказаться от отдельного этапа регистрации: практически устранил угрозу контаминации специфическими продуктами реакции.

Метод основан на измерении флуоресцентного сигнала в каждом цикле амплификации. Интенсивность сигнала пропорциональна концентрации конечного продукта ПЦР. Важнейшей особенностью метода является синхронизация регистрации и амплификации. Это дает возможность оценить кинетику процесса, которая зависит от начального количества исследуемого генетического материала. Как правило, прилагаемое программное обеспечение позволяет осуществлять эту операцию автоматически. К достоинствам данного метода можно отнести: высокую точность анализа, ультрачувствительность и специфичность. Было показано, что в сравнении с другими количественными методами ПЦР-диагностики, ПЦР в реальном времени является наиболее эффективной и наименее трудоемкой методикой, однако она позволяет определить ограниченное число мутантных аллелей.

Для определения мутантных аллелей BRCA1/2 в реакционную смесь добавляют ДНК-зонды, в состав которых входит флуоресцентная метка и гаситель флюоресценции. Когда зонд находится в растворе гаситель поглощает испускаемое флуоресцентной меткой излучение и свечение отсутствует. В ходе ПЦР происходит присоединение ДНК-зонда к комплементарной цепи ДНК, происходит разъединение флуоресцентной метки и гасителя, что приводит к увеличению детектируемого свечения. Очевидно, что чем больше ампликонов было наработано на данный момент времени, тем интенсивнее будет свечение.

Новые технологии секвенирования позволили усовершенствовать открытый более 30 лет назад основанный на электрофорезе метод Сэнгера, недостатками которого являются низкая пропускная способность и относительно высокая стоимость.

Секвенирование производится путем синтеза новых фрагментов ДНК на одноцепочечных ДНК-библиотеках, которые выполняют роль матрицы. Нуклеотиды встраиваются в новую цепь в определенном порядке, соответствующем матричной цепи, который записывается в цифровом виде. После включения в цепь каждого последующего нуклеотида прибор регистрирует сигнал.

Метод секвенирования нового поколения (далее – NGS) имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами: высокая точность анализа, универсальность (секвенирование ампликонов, малых геномов (вирусы), анализ экзонов и т.д.), возможность мультиплексного анализа и самое важное определение любых мутаций имеющихся в базе данных, а в редких случаях регистрация новых мутантных аллелей.

Перспективным методом детекции мутантных аллелей BRCA1/2 является метод ДНК-микрочипов. ДНК-микрочип представляет собой компактный планшет, содержащий набор зондов, иммобилизованных на плоской поверхности нейлоновых мембран (макроскопические матрицы) на стекле (микроскопические матрицы), либо синтезируемых *in situ* на твердой фазе (стекло, пластик, силикон). В последние годы микрочипы превратились в целое направление биологической науки: десятки фирм предлагают биологические микрочипы, содержащие массивы из тысячи и более зондов.

В целом данная технология позволяет определять в одном образце почти неограниченное количество маркеров, что имеет некоторые перспективы в диагностике и скрининге онкологических заболеваний. Этапы детекции и оценки результатов автоматизированы и проводятся на стандартных наборах, что позволяет получать воспроизводимые результаты за короткое время – 4–6 часов. Однако, метод требует дорогостоящего оборудования [5].

Решения относительно тактики лечения РМЖ у носителей мутаций BRCA1/2 должны базироваться на тех же параметрах, что и лечение спорадического РМЖ при учете более высокого риска РКМЖ и ипсилатерального рецидива при проведении органосохраняющей операции и радиотерапии у больных, не подвергающихся оварио-эктомии. Эффективность адьювантной лучевой терапии продемонстрирована в ряде исследований с длительным периодом наблюдения. Действительно, рецидив РМЖ после органосохраняющей операции и лучевой терапии у носителей BRCA1/2 мутаций не выше, чем у больных РМЖ без семейной истории.

При мутации BRCA1/2 в клетке нарушаются процессы reparации DSB, что делает их чувствительными к лечению ДНК повреждающими агентами (цистплатин, гемцитабин и т.д.).

В BRCA1/2 дефицитных клетках в качестве компенсаторной реакции активизируются процессы однонитевого отжига. При использовании ингибиторов фермента PARP-1, клетки не могут эффективно восстанавливать однонитевые разрывы в результате этого приводят к нестабильности генома и переходу клетки в апоптоз.

В качестве профилактических мер используют активное динамическое наблюдение за пациентами входящими в группу риска, химиопрофилактика и хирургическая профилактика.

Для химиопрофилактики применяют антагонисты эстрогена (тамоксифен, релоксифен). Плацебо контролируемые исследования тамоксифена показали снижение числа случаев РМЖ в группе риска на 40–50% по сравнению с плацебо.

Профилактическая мастэктомия контралатеральной молочной железы с одномоментной реконструктивной операцией является наиболее эффективным методом снижения риска развития РМЖ, так как уменьшает риск его развития до 96%. А одномоментное выполнение реконструктивной операции положительно оказывается на психоэмоциональном состоянии женщин. Анжелина Джоли – известная кинозвезда – перенесла двухстороннюю мастэктомию, чтобы предотвратить развитие рака этой локализации [1].

Патологические аллели генов BRCA1/2 определяют наследственную предрасположенность к РМЖ. Мутации в генах BRCA1/2 приводят к нарушению синтеза ER и функционирования reparативных систем, что значительно повышает риск развития РМЖ у женщин и в меньшей степени, раков других локализаций (рак поджелудочной железы, рак желудка и рак головы и шеи, и т.д.). У мужчин риск развития РМЖ в десятки раз ниже, чем у женщин.

Наличие эффекта основателя значительно упрощает проведение масштабного генетического скрининга.

Своевременный генетический скрининг позволяет:

1. Оценить риск развития РМЖ у пациента и подобрать наиболее эффективные профилактические меры (наблюдение, химиопрофилактика, мастэктомия).

2. Составить предварительные сведения о структуре, локализации и злокачественности РМЖ (в большинстве случаев преобладает РКМЖ инфильтративно-протокового типа с высокой степенью злокачественности).

3. Подобрать эффективную схему лечения, так как мутации генов BRCA1/2 делают геном раковых клеток нестабильным и уязвимым к DSB.

4. Определить вероятность передачи мутантных аллелей по наследству.

Из современных методов молекулярно-генетической диагностики для проведения генетического скрининга можно выделить: ПЦР в режиме реального времени, NGS, технологию ДНК-микрочипов. С точки зрения эффективности привлекательно выглядит метод NGS позволяющий определить полную нуклеотидную последовательность генов BRCA1/2 и сравнить с имеющимися в базе данных вариантами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Смолянка, И. И. Профилактическая мастэктомия: взгляд на проблему / И. И. Смолянка // Клиническая онкология. – 2013. – №2. – С. 68–70.
2. Prakash, R. Homologous Recombination and Human Health: The Roles of BRCA1, BRCA2, and Associated Proteins / R. Prakash [et al.] // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2015. – № 7. – P. 1–27.
3. Lakhani, S. R. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype / S. R. Lakhani [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2005. – № 11 – P. 5175–5180.
4. Ходорович, О. С. BRCA-ассоциированный рак молочной железы. Особенности хирургической профилактики и лечения / О. С. Ходорович [и др.] // Исследования и практика в медицине : материалы Второго Национального конгресса «Онкология репродуктивных органов: от профилактики и раннего выявления к эффективному лечению», Москва, 11–13 мая 2017 г. : тез. докл. / ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения России; ред.: Каприн А. Д. [и др.] – Москва, 2018. – 95 с.
5. Сороковиков, И. В. Диагностические тесты в онкологии: от маркеров к сложным тест-системам / И. В. Сороковиков // Современная организация лекарственного обеспечения. – 2013.– № 3. – С. 28–38.

ПРИМЕНЕНИЕ МУЛЬТИСПЕКТРАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ВКЛЮЧЕНИЙ

APPLICATION OF MULTISPECTRAL MICROSCOPY FOR VISUALIZATION INTRACELLULAR INCLUSIONS

С. В. Глушен, А. В. Максимович, Е. А. Маслюков, М. Мятиева
S. Gloushen, A. Maksimovich, E. Masluykov, M. Matiyeva

Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Беларусь

massl2001@yandex.by

Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Belarus

Мультиспектральная микроскопия представляет собой сочетание спектрального анализа и компьютерной обработки изображений. Нами с помощью данного метода исследованы спектры пропускания цитологических препаратов рака шейки матки, окрашенных гематоксилином и эозином. В видимой области (400–700 нм) содержащиеся в препаратах клеточные ядра и цитоплазма эпителиальных клеток, а также эритроциты демонстрируют однотипные спектры пропускания, которые отличаются лишь соотношением