



Журман В.Н.¹✉, Плехова Н.Г.², Филипенко М.Л.³

¹ Приморский краевой онкологический диспансер, Владивосток, Россия

² Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Мутационный статус генов BRCA при раке яичников

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Плехова Н.Г., Журман В.Н., Филипенко М.Л. Сбор и обработка материала – Плехова Н.Г., Журман В.Н., Филипенко М.Л. Статистическая обработка – Плехова Н.Г., Журман В.Н. Написание текста – Журман В.Н. Редактирование – Журман В.Н.

Финансирование: авторы заявляют о финансировании проведенного исследования из собственных средств.

Подана: 11.04.2022

Принята: 15.05.2022

Контакты: varvara2007@yandex.ru

Резюме

Носители герминальных мутаций генов – супрессоров опухолей BRCA1/2 (Brest cancer gene 1/2) имеют повышенный риск развития рака молочной железы, яичников. Также в результате соматических мутаций функциональность BRCA теряется только в одной клетке, которая может стать мутагенной и дать начало злокачественной опухоли.

Материалы и методы. Проводили анализ генов BRCA1/2 образцов ДНК из лейкоцитов (n=143) и фиксированных в формалине и залитых в парафин (FFPE) тканей опухоли (n=208) пациентов (n=306) с раком яичника. Мультиплексная амплификация целевых последовательностей ДНК осуществлялась с помощью ПЦР, данные секвенирования обрабатывались с использованием программного обеспечения BRCA-analyzer. Установлено, что в группе BRCA1/2-положительных пациенток, как и в группе отрицательных, преимущественно выявлен рак яичника высокой степени злокачественности (high-grade). Согласно спектру патогенных мутаций генов BRCA определено, что 101 пациент с раком яичника был носителем мутаций гена BRCA1 (88,1%) и 6 мутаций гена BRCA2 (11,9%). Не обнаружено ни одного обследуемого с одновременным носительством мутаций в обоих генах. Было определено 86 пациентов – носителей герминальных мутаций гена BRCA1, гена BRCA2 – 11 человек. Достоверное различие показателей общей продолжительности жизни было обнаружено между группами обследованных, где у пациентов с наличием мутаций она составила 62 месяца (p=0,003). Таким образом, показано, что мутации BRCA1/2 связаны с повышением продолжительности общей выживаемости, но улучшение наблюдалось только у пациентов с первичным и рецидивирующим заболеванием, а не у пациентов с запущенным заболеванием. Тем не менее, мутации BRCA1 и BRCA2 по отдельности не были связаны с указанным показателем, хотя эти результаты были ограничены небольшим количеством исследований. Дальнейшее выяснение характеристик мутаций и их влияния на выживаемость пациентов и ответ на терапию может привести к более индивидуализированному подходу к лечению рака яичников и улучшению результатов.

Ключевые слова: BRCA1/2, рак яичников, общая выживаемость

Zhurman V.¹✉, Plekhova N.², Filipenko M.³

¹ Primorsky Regional Oncological Dispensary, Vladivostok, Russia

² Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Mutational Status of BRCA Genes in Ovarian Cancer

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: the concept and design of the study – Plekhova N., Zhurman V., Filipenko M. Collection and processing of material – Plekhova N., Zhurman V., Filipenko M. Statistical processing – Plekhova N., Zhurman V. Writing a text – Zhurman V. Editing – Zhurman V.

Funding: the authors claim to finance the study from their own funds.

Submitted: 11.04.2022

Accepted: 15.05.2022

Contacts: varvara2007@yandex.ru

Abstract

Carriers of germinal mutations of BRCA1/2 tumor suppressor genes (Brest cancer gene 1/2) have an increased risk of developing breast and ovarian cancer. Also, as a result of somatic mutations, BRCA functionality is lost only in one cell, which can become mutagenic and give rise to a malignant tumor.

Materials and methods. BRCA1/2 genes of DNA samples from leukocytes (n=143) and formalin-fixed and paraffin-coated (FFPE) tumor tissues (n=208) of patients (n=306) with ovarian cancer were analyzed. Multiplex amplification of target DNA sequences was carried out using PCR, sequencing data was processed using BRCA-analyzer software. It was found that in the BRCA group of 1–2 positive patients, as well as in the negative group, ovarian cancer of a high degree of malignancy (high-grade) was mainly detected. According to the spectrum of pathogenic mutations of BRCA genes, it was determined that 101 ovarian cancer patients were carriers of BRCA1 gene mutations (88.1%) and 6 BRCA2 gene mutations (11.9%). Not a single subject with simultaneous carrier of mutations in both genes was found. 86 patients were identified as carriers of germinal mutations of the BRCA1 gene and the BRCA2 – 11 gene in humans. A significant difference in the overall life expectancy was found between the groups examined, where in patients with mutations it was 62 months (p=0.003). Thus, it was shown that BRCA1/2 mutations are associated with an increase in the duration of overall survival, but the improvement was observed only in patients with primary and recurrent disease, and not in patients with advanced disease. However, BRCA1 and BRCA2 mutations were not individually associated with this indicator, although these results were limited by a small number of studies. Further elucidation of mutation characteristics and their impact on patient survival and response to therapy may lead to a more individualized approach to ovarian cancer treatment and improved outcomes.

Keywords: BRCA 1/2, ovarian cancer, overall survival

■ ВВЕДЕНИЕ

Рак яичников занимает второе место по распространенности злокачественных новообразований половой сферы у женщин развитых стран и является наиболее частой причиной смерти [1]. Заболевание чаще возникает у женщин в постменопаузе, клиническими признаками являются боли и вздутие живота в течение длительного периода. К сожалению, большинство опухолей яичника у пациентов выявляются на поздней стадии (Международной федерации гинекологии и акушерства (FIGO)), когда стандартом лечения остается хирургическое вмешательство и химиотерапия в комбинации таксанов и препаратов платины. В условиях отсутствия скрининговых программ, направленных на выявление ранних стадий рака яичников, особенное значение приобретают методы молекулярно-генетического анализа.

Гены BRCA 1 и 2 (Breast cancer susceptibility risk) относятся к генам – супрессорам опухолей и размещаются на 17-й хромосоме в 24-м экзоне, а BRCA2 на 13-й хромосоме в 27-м экзоне соответственно [2]. Их экспрессия в нормально функционирующей клетке задействована в синтезе белков, контролирующих репарацию ДНК после повреждений для стабильного состояния генома и предотвращения накопления ошибок в его реализации. Изменение функциональности BRCA генов приводит к сбою контроля клеточного деления и перерождению клетки в злокачественную. Наиболее чувствительные к таким изменениям экспрессии генов являются клетки молочной железы и яичников [3, 4]. Большинство из более чем 9000 мутаций генов относятся к точечным, небольшим и крупным делециям/инсерциям и не оказывают значительного влияния на вероятность развития рака. Негативное влияние экспрессии измененных генов BRCA, которое сопровождается малигнизацией клеток, относят к патогенным, и было идентифицировано более 3500 таких мутаций [5]. Анализ риска развития опухоли, связанного с мутацией генов BRCA, включает многие факторы, такие как их положение в геноме, изучаемую популяцию населения, влияние окружающей среды, образа жизни и другие генетические модификаторы. Показано, что носители герминальных мутаций BRCA имеют повышенный риск развития рака молочной железы, яичников и некоторых других форм рака [2]. В результате соматических мутаций функциональность BRCA теряется только в одной клетке, которая может стать раковой и дать начало опухоли. В этом случае мутация BRCA будет выявляться только в материале опухоли, но не в крови или других тканях организма. Когда рак вызван соматической мутацией BRCA, вероятность возникновения других видов рака у пациента не выше, чем у других людей – носителей мутации в гене BRCA. Следовательно, предполагаемый риск рака для одного носителя мутации BRCA не может быть обобщен на всю популяцию носителей гена BRCA. Тем не менее, информация о наиболее распространенных мутациях BRCA1/2 при раке яичника и определение количества их носителей могут быть полезными для разработки эффективных скрининга и терапии данного заболевания.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Представить характеристику мутаций генов BRCA1/2, распространенных у пациентов с раком яичника, и определить связь между клиническим фенотипом, общей выживаемостью (OS) и наличием мутаций генов BRCA1/2.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ генов BRCA1/2 выполнен в рамках программы «Совершенствование молекулярно-генетической диагностики в Российской Федерации с целью повышения эффективности противоопухолевого лечения» (<http://www.cancergenome.ru>) на базе референтной лаборатории (Lab. Pharmacogenomics, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences). Изучались образцы ДНК из лейкоцитов (n=143) и фиксированных в формалине и залитых в парафин (FFPE) тканей опухоли (n=208) пациентов (n=306), содержащие не менее 10% опухолевых клеток. Мультиплексная амплификация целевых последовательностей ДНК осуществляется с помощью ПЦР с использованием определенного числа (N, вариация от 46 до 50) пар ген-специфичных праймеров, несущих на 5'-концах универсальные последовательности, и одной пары универсальных праймеров, комплементарных указанным хвостам. В первых циклах амплификации добавлялись ген-специфичные праймеры в низкой концентрации (1–32 нМ), последующие циклы осуществлялись с использованием универсальных праймеров в высокой концентрации (500 нМ). Вспомогательные последовательности (пациент-специфичные индексирующие последовательности и последовательности, необходимые для секвенирования (p5, p7)) вводились во втором раунде ПЦР путем добавления пары индексирующих праймеров до 1 мкМ концентрации в реакционной смеси. Продукты мультиплексных ПЦР от каждого пациента объединялись, очищались от компонентов реакционного буфера и неспецифических продуктов амплификации путем использования селективной (в зависимости от длины фрагментов ДНК) сорбции на магнитных частицах (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter). Определялась концентрация целевых продуктов ПЦР (Qubit 2.0, Thermo Fisher Scientific) отдельно для каждого пациента, и анализируемые образцы объединялись в библиотеку в эквимолярном соотношении. Концентрация суммарной библиотеки осуществлялась при помощи набора KAPA Library Quantification Kits, KAPABiosystems. Полученная библиотека секвенировалась на приборе MiniSeq с использованием набора реагентов High Output Reagent Kit (300 cycles). Данные секвенирования обрабатывались с использованием программного обеспечения BRCA-analyzer [6]. При анализе данных NGS (next generation sequencing) учитывались следующие вариации последовательностей BRCA1/2: (1) frameshift, stop gained, stop lost, start lost, splice acceptor, splice donor варианты; (2) missense и splice region варианты, зарегистрированные в ClinVar database как «Pathogenic» или «Likely pathogenic». Классификация вариантов на «соматические» и «герминальные» осуществляется при сравнении вариантов ДНК лейкоцитов и FFPE опухоли: варианты, обнаруженные в ДНК лейкоцитов, – герминальные; варианты, обнаруженные в ДНК FFPE опухоли, но отсутствующие в лейкоцитах, – соматические. Эталонные последовательности GenBank NM_007294.3 и NM_000059.3 использовали для анализа BRCA1 и BRCA2 соответственно. Номенклатура мутаций описана согласно Human Genome Variation Society [7]. Анализы были выполнены с помощью биоинформатических инструментов: анализатор эффектов вариации PROtein (PROVEAN), фенотипирование полиморфизма 2 (PolyPhen-2).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

В период с 2016 г. по 2021 г. обследованы 384 женщины с эпителиальным раком яичников I–IV стадии на наличие мутаций в генах BRCA1/2. Из них не обнаружено

мутаций в этих генах у 283/384 (73,7%) пациенток и выявлены у 101/384 (26,3%). Клиническая характеристика обследованных пациенток представлена в табл. 1. Средний возраст пациенток с раком яичников на момент установления диагноза составил в группе без мутации 54,1 и в группе с наличием мутации 52,7. При распределении пациенток по стадиям соответственно наличию мутаций на долю I стадии пришлось 7,9%, II стадии – 5,0%, IIIA, B стадии – 41,6%, IIIC–IV стадии – 45,5%, в группе без наличия мутаций на долю I стадии пришлось 23,4%, II стадии – 7,7%, IIIA, B стадии – 8,8%, IIIC–IV стадии – 60,1%. У всех обследованных отмечалось повышение онкомаркера СА125 в сыворотке крови, причем у группы носителей мутаций в 100% случаев.

При анализе морфологической дифференцировки опухолевых клеток в группе BRCA1/2-положительных пациенток, как и в группе отрицательных, преимущественно выявлен серозный рак high-grade. В отношении наличия вторичной опухоли и наследственного анамнеза онкологических заболеваний различий между группами также не обнаружено. Достоверное различие показателей общей продолжительности жизни было обнаружено между группами обследованных, где у пациентов с наличием мутаций она составила 62 месяца.

Таблица 1
Клиническая характеристика обследованных пациенток с раком яичника соответственно выявленным мутациям BRCA1/2
Table 1
Clinical characteristics of the examined patients with ovarian cancer respectively identified by BRCA1/2 mutations

Характеристика пациенток	Мутаций BRCA1/2 не обнаружено (n=283)		Наличие мутаций BRCA1/2 (n=101)	
	Количество пациенток			
Средний возраст на момент установления диагноза	54,1 (22–79)		52,7 (31–77)	
Стадия				
I	66/283	23,4%	8/101	7,9%
II	22/283	7,7%	5/101	5,0%
III	25/283	8,8%	42/101	41,6%
IV	170/283	60,1%	46/101	45,5%
Морфологический тип опухоли				
Серозный low-grade	127/283	44,9%	12/101	11,8%
Серозный high-grade	133/283	47,0%	81/101	80,3%
Не указан	23/283	8,1%	8/101	7,9%
Онкомаркер СА125				
Не превышающий норму	19/283	6,7%	–	–
Повышенный	264/283	93,3%	101/101	100,0%
Наличие второй опухоли				
Наличие	28/283	9,9%	16/101	15,8%
Отсутствие	255/283	90,1%	84/101	83,2%
Наследственный анамнез				
Отягощен	101/283	35,7%	48/101	47,5%
Не отягощен	182/283	64,3%	53/101	52,5%
ОВ, мес.	37,7		62*	

Примечание: * наличие различия между группами при $p < 0,05$. Источник: [Составлено авторами].



Таблица 2
Разновидности мутаций в генах BRCA1/2 у пациенток с раком яичников
Table 2
Types of mutations in BRCA1/2 genes in patients with ovarian cancer

Тип мутаций	Количество пациенток, % (n=101)	
Мутации BRCA1 89/101 (88,1%)		
Герминальные 86/89 (96,6%):		
c.53T>C	1/101	1,0%
c.1813dupA	1/101	1,0%
c.185delAG	3/101	2,9%
300T>G	1/101	1,0%
c.843_846delCTCA	1/101	1,0%
c.1510delC	1/101	1,0%
c.1874_1877DUPTAGT	1/101	1,0%
c.1961delA	1/101	1,0%
c.2080delA	5/101	5,0%
c.2808_2811delACAA	1/101	1,0%
c.3008_3009delTT	1/101	1,0%
c.3100_3101delAT	1/101	1,0%
c.3700_3704delGTAAA	3/101	2,9%
c.3756delGTCT	1/101	1,0%
c.3819delGTCT	3/101	3,0%
c.3875delGTCT	1/101	1,0%
c.4035	1/101	1,0%
c.4153delA	10/101	9,9%
c.4431delT	1/101	1,0%
c.4516delG	1/101	1,0%
c.4689C>G	3/101	2,9%
c.5075-1G>A	1/101	1,0%
c.5145C>G	1/101	1,0%
c.5200G>T	1/101	1,0%
c.5266dupC	14/101	13,8%
c.5382insC	26/101	25,7%
c.8924T	1/101	1,0%
Соматические 3/89 (3,4%):		
Протяженная делеция экзонов 7–11 в гене	1/101	1,0%
Протяженная делеция экзонов 17–23 гена	1/101	1,0%
CNV	1/101	1,0%
Мутации BRCA2 12/101 (11,9%)		
Герминальные:		
6174delT	6/101	5,9%
c.51_52delAC	1/101	1,0%
c.7007G>A	1/101	1,0%
c.7251_7252	1/101	1,0%
c.7069_7070delCT	1/101	1,0%
c.1278dupA	1/101	1,0%
Соматические:		
c.8078_8079delTA	1/101	1,0%

Согласно спектру патогенных мутаций генов BRCA1/2 определено, что 89 (88,1%) из 101 пациентки с раком яичников – носители мутаций гена BRCA1 и 12/101 (11,9%) – мутаций гена BRCA2. На долю герминальных мутаций в гене BRCA1 пришлось 86/89 (96,6%) и соматических 3/89 (3,4%) соответственно. Наиболее распространенные мутации, выявленные в гене BRCA1: с.5382insC у 26/101 (25,7%), с.5266dupC у 14/101 (13,8%), с.4153delA у 10 (9,9%) из 101 пациентки соответственно. В гене BRCA2 наиболее часто встречающаяся мутация 6174delT выявлена у 6 (5,9%) из 101 пациентки (табл. 2).

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Целью нашего исследования являлось изучение распространенности мутаций BRCA1/2 у пациентов с раком яичников. В выборку обследуемых были включены женщины, которые ответили на вопросы анкеты, включающие семейный анамнез и данные по генетической предрасположенности к онкозаболеваниям, и большинство из них согласилось участвовать в этом исследовании. Несмотря на то, что это не была случайная выборка, размер выборки должен компенсировать возможную систематическую ошибку и предоставить более общую информацию о вкладе мутаций гена BRCA1/2 в развитие рака яичника. Общие результаты показали, что наличие мутаций BRCA1/2 связано с увеличением общей продолжительности жизни у обследованных. Мутации BRCA1/2 связаны с улучшенным ответом на препараты на основе платины при химиотерапии, однако молекулярный механизм, который приводит к увеличению общей выживаемости пациентов, до конца не изучен [3].

BRCA1/2 являются генами – супрессорами опухолей, и инициация при их участии синтеза белков играет важную роль в восстановлении поврежденной ДНК посредством гомологичной рекомбинации [10]. Показано, что большинство карцином, связанных с делециями нуклеотидов в генах BRCA1/2, приводят к дефициту генных белков [10]. В этом случае в клетках опухоли определяется сниженная способность восстанавливать ДНК, что является механизмом, с помощью которого мутации приводят к повышенной восприимчивости к раку. Дефицит белка также приводит к чувствительности к гемотерапевтическим агентам на основе платины, предположительно в результате неспособности восстанавливать двухцепочечные разрывы ДНК, вызванные химиотерапией. Нами показано, что у пациентов с раком яичника в большем количестве выявлялись мутации гена BRCA1 с.5382insC и с.5266dupC, тогда как мутации гена BRCA2 были единичными. Проведенный анализ имел некоторые ограничения, такие как уровни экспрессии BRCA, метилирование промотора, эпигенетические изменения и другие факторы риска, которые также могут оказывать влияние на реакцию в ответ на терапию. Количество проведенных исследований, в которых анализировался только BRCA1 и только BRCA2, заметно различается, и причина может заключаться в том, что у пациентов с раком яичников мутация BRCA1 встречается с большей частотой, чем мутация BRCA2, как и продемонстрировано нашими исследованиями [3, 6].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что мутации BRCA1/2 связаны с увеличением общей выживаемости. Тем не менее, мутации BRCA1 и BRCA2 по отдельности не связаны с указанным показателем, хотя эти результаты ограничены небольшим количеством исследований.



Дальнейшее выяснение характеристик мутаций и их влияния на выживаемость пациентов и ответ на терапию может привести к более индивидуализированному подходу к лечению рака яичников и улучшению результатов.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ruiz de Sabando A., Urrutia Lafuente E., García-Amigot F., Alonso Sánchez A., Morales Garofalo L., Moreno S., Ardanaz E., Ramos-Arroyo M.A. Genetic and clinical characterization of BRCA-associated hereditary breast and ovarian cancer in Navarra (Spain). *BMC Cancer*. 2019;19(1):1145.
2. Lee M.V., Katabathina V.S., Bowerson M.L., Mityul M.I., Shetty A.S., Elsayes K.M., Balachandran A., Bhosale P.R., McCullough A.E., Menias C.O. BRCA-associated Cancers: Role of Imaging in Screening, Diagnosis, and Management. *Radiographics*. 2017;37(4):1005–1023.
3. Huang Y.W. Association of BRCA1/2 mutations with ovarian cancer prognosis: An updated meta-analysis. *Medicine*. 2018 97(2):e9380.
4. Tung N.M., Garber J.E. BRCA1/2 testing: therapeutic implications for breast cancer management. *Br J Cancer*. 2018;119(2):141–152.
5. Petrucelli N., Daly M.B., Feldman G.L. Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genet Med*. 2010;12(5):245–259.
6. Kechin A., Boyarskikh U., Ermolenko N., Tyulyandina A., Lazareva D., Avdalyan A. Loss of heterozygosity in BRCA1 and BRCA2 genes in patients with ovarian cancer and probability of its use for clinical classification of variations. *Bull Exp Biol Med*. 2018;165:94–100.
7. *Human Genome Variation Society*. Available at: <https://www.hgvs.org/> (accessed 30 Sept 2019).
8. Gomes R., Soares B.L., Felicio P.S. Haplotypic characterization of BRCA1 c.5266dupC, the prevailing mutation in Brazilian hereditary breast/ovarian cancer. *Genet Mol Biol*. 2020;43(2):e20190072.
9. Muggia F., Safra T. 'BRCAness' and its implications for platinum action in gynecologic cancer. *Anticancer Res*. 2014;34:551–556.