О.В. Палійчук[1, 2]
З.І. Россоха[3]
Ф.М. Галкін[2]
Л.З. Поліщук[1]

[1]Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

[2]КЗ «Черкаський обласний онкологічний диспансер» ЧОР, Черкаси

[3]ДУ «Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України», Київ, Україна

Ключові слова: *BRCA2 6174delT мутація, спадковий рак молочної залози, рак яєчника, множинні пухлини, родовід.*

МУТАЦІЯ 6174delT В ГЕНІ *BRCA2* У РОДИНІ З АГРЕГАЦІЄЮ ПУХЛИННОЇ ПАТОЛОГІЇ (КЛІНІЧНИЙ ВИПАДОК)

Мета: *проаналізувати результати клінічного, клініко-генеалогічного та молекулярно-генетичного обстеження членів родини з агрегацією пухлинної патології у двох поколіннях.* ***Об'єкт і методи:*** *досліджено дані пробанда, її батьків, сестер, дочки. Молекулярно-генетичне дослідження включало ідентифікацію методом мультиплексної алельспецифічної полімеразної ланцюгової реакції мутацій 5382insC та 185delAG в гені BRCA1 і 6174delT у гені BRCA2 у тканині пухлин пробанда та периферичній крові її дочки.* ***Результати:*** *встановлено білатеральний рак молочної залози (РМЗ) і рак яєчника у пробанда, РМЗ у однієї з її сестер, первинно-множинні пухлини (РМЗ і рак ендометрія) у матері, рак легені у батька пробанда. Молекулярно-генетичне дослідження гістологічних зрізів РМЗ пробанда показало відсутність мутацій 5382insC та 185delAG у гені BRCA1 і мутацію 6174delT у гені BRCA2 у гетерозиготному стані. Аналогічна делеція в цьому гені (але у гомозиготному стані) визначена у пухлині яєчника пробанда та периферичній крові її практично здорової дочки.* ***Висновок:*** *одержані дані вказують на значення гермінальної мутації 6174delT у гені BRCA2 у розвитку спадкових і множинних пухлин у цій родині. Знання сімейної історії та генетичне тестування важливі для оцінки генетичного статусу членів родини з онкологічною патологією.*

Рак молочної залози (РМЗ) продовжує залишатися актуальною проблемою, займаючи перше рангове місце у структурі онкологічної захворюваності жінок багатьох країн світу. Клініко-генеалогічними дослідженнями чітко встановлено, що РМЗ, як і низка інших злоякісних пухлин, належить до мультифакторної патології, у схильності до розвитку якої мають значення генетичні фактори та чинники навколишнього середовища. Завдяки розвитку молекулярно-генетичних технологій ідентифіковано гени, асоційовані з виникненням і прогресуванням РМЗ, а також із розвитком спадкових форм РМЗ. До них належать високопенетрантні гени *BRCA1* та *BRCA2*. Частка *BRCA1*- та *BRCA2*-асоційованого РМЗ становить відповідно 45 і 35% [1]. Зазначені гени є супресорами пухлинного росту, задіяними у репарації пошкоджень ДНК і збереженні генетичної стабільності клітин. Тому їх мутації, які викликають порушення генетичного гомеостазу клітин, є критичними для функції клітин молочної залози. Дані літератури свідчать, що у жінок до 70 років ризик розвитку РМЗ за умови мутації *BRCA1* є високим — 45–87%, ризик розвитку раку яєчника (РЯ) — нижчим — 36–66% [2].

Протягом останніх 3 років ми проводимо клінічні, клініко-генеалогічні та молекулярно-генетичні дослідження у хворих на РМЗ, які лікуються у КЗ «Черкаський обласний онкологічний диспансер». Молекулярно-генетичні методи включають ідентифікацію мутацій 5382insC і 185delAG у гені *BRCA1*, 6174delT — у гені *BRCA2* в операційному матеріалі та периферичній крові шляхом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції. Вважаємо, що один клінічний випадок заслуговує на особливу увагу у зв'язку з виявленим спадковим РМЗ і наявністю первинно-множинних пухлин у родині пробанда та асоціацією діагностованих РМЗ і РЯ з мутацією 6174delT *BRCA2*, яка є не настільки частою, як мутації *BRCA1*.

КЛІНІЧНЕ СПОСТЕРЕЖЕННЯ № 36

Пробанд — ***хвора ГВА***, 1948 р. народження, мешканка м. Черкаси, українка, професія — учитель. Акушерський анамнез: пологи — 2 (у віці 28 та 30 років), аборти — 0, викидні — 0, менархе в 12 років, менструації — протягом 5 днів через 28–30 днів, менструальний цикл регулярний, лактація — 6 міс. Менопауза з 47 років. У 32 роки діагностована фіброзно-кістозна мастопатія, з приводу якої пацієнтка отримувала консервативну медикаментозну терапію. Лікувалася також з приводу хронічного запалення придатків матки. У віці 36 років при ультразвуковому дослідженні у нижньозовнішньому квадранті лівої молочної залози виявлено пухлину, злоякісний характер якої підтверджено при мамографії. Після комплексного клінічного дослідження встановлено діагноз РМЗ II стадія (T2N0M0). Хворій проведено операцію — мастектомію за Пейті, ад'ювантну променеву терапію на ділянку післяопераційного рубця, зони лімфогенного метастазу-

вання у загальній дозі 40 Гр. Пацієнтка була взята на диспансерний облік і протягом 2 років приймала тамоксифен (по 20 мг). Через 21 рік, у віці 57 років, звернулася до онколога з приводу пухлини у контралатеральній молочній залозі (верхньовнутрішній квадрант), при мамографії якої встановлено діагноз РМЗ III стадія (T4N1M0). При огляді онкогінекологом діагностовано синхронний РЯ IIIC стадії (T3N0M0). Одночасно проведено мастектомію за Пейті та неоптимальну циторедуктивну операцію (двобічна аднексектомія) і призначено 4 курси поліхіміотерапії: 2 курси за схемою «доксорубіцин 100 мг + циклофосфамід 1000 мг + флуороурацил 1000 мг», 2 курси за схемою «метотрексат 140 мг + флуороурацил 2000 мг + циклофосфамід 2000 мг». Потім виконано оптимальну циторедуктивну операцію — пангістеректомію та оментектомію — і проведено 6 курсів ад'ювантної поліхіміотерапії за схемою «цисплатин 100 мг + доксорубіцин 100 мг + циклофосфамід 1000 мг» без редукції дози. Хвора перебуває під регулярним спостереженням, наразі у неї ремісія.

Патогістологічні висновки: 1) пухлина лівої молочної залози — медулярний рак із солідними полями атипового епітелію; 2) пухлина правої молочної залози — інфільтративний протоковий рак, ступінь диференціювання G2, з тубулярними та трабекулярними структурами, з помірною кількістю мітозів; інвазія пухлини у шкіру; люмінальний A (ER+, PR+, HER2−) молекулярний підтип (аналіз експресії рецепторів гормонів і HER2/neu за шкалою Histochemical score by McCarthy); 3) пухлина яєчника — серозно-папілярний РЯ з метастазуванням у контралатеральний яєчник, великий сальник, помірний ступінь диференціювання (G2). Папілярні структури раку покриті атиповим епітелієм трубно-яєчникового типу з помірно вираженим поліморфізмом ядер пухлинних клітин.

Клініко-генеалогічний аналіз родини пробанда (рис. 1) виявив агрегацію РМЗ, який був діагностований у її рідної сестри (у віці 55 років) і матері (у віці 65 років). Ще в однієї сестри виявлено фіброаденому молочної залози (у 44 роки). Привертає увагу розвиток первинно-множинних пухлин як у пробанда (РМЗ і РЯ), так і її матері (РМЗ і рак тіла матки у віці 69 років). У батька пробанда у віці 50 років діагностовано рак легені.

Для підтвердження спадкового характеру пухлин у пробанда проведено (у ДУ «Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України») молекулярно-генетичне дослідження гістологічних зрізів РМЗ та РЯ. Для визначення мутацій 185delAG та 5382insC в гені *BRCA1* та 6174delT у гені *BRCA2* використовували модифіковані протоколи з олігонуклеотидними праймерами із застосуванням алельспецифічної полімеразної ланцюгової реакції. Досліджувані ділянки генів ампліфікували за допомогою специфічних праймерів («Metabion», Німеччина). Стан ампліфікаційних фрагментів аналізували в 2,5% агарозному гелі (агароза фірми «Thermo Scientific», США), з додаванням бромистого етидію, маркера молекулярної маси GeneRuler 50 bp DNA Ladder («Thermo Scientific», США) та подальшою візуалізацією за допомогою комп'ютерної програми Vitran.

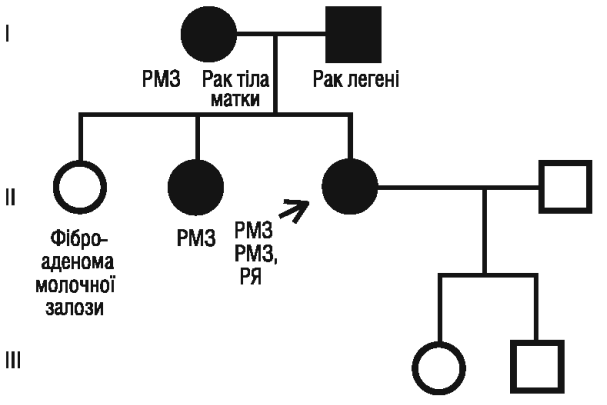

Рис. 1. Клініко-генеалогічний аналіз родини пробанда з РМЗ

Проведене молекулярно-генетичне дослідження гістологічних зрізів пухлин показало відсутність мутацій у гені *BRCA1* і наявність делеції 6174delT у гені *BRCA2* у гетерозиготному (РМЗ) і гомозиготному стані (РЯ) (рис. 2).

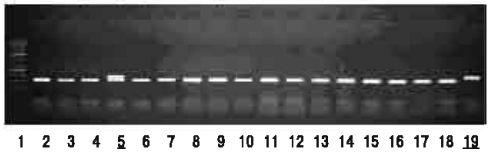

Рис. 2. Електрофореграма 6174delT *BRCA2*. Розподіл продуктів ампліфікації, згідно з яким у пухлині молочної залози пробанда виявлено делецію у гетерозиготному стані (лунка 5) і у пухлині яєчника — у гомозиготному стані (лунка 19). Примітка: 1 — маркер молекулярної маси

З урахуванням одержаних результатів було вирішено провести комплексне обстеження дочки пробанда (1989 р. народження, жителька м. Черкаси). З анамнезу: менархе — у 14 років, менструації — по 4–5 днів через 30 днів, регулярні; пологи та викидні — 0, аборт — 1 (4–5-й тиждень вагітності у віці 21 року). У 24 роки діагностовано цервікальну інтраепітеліальну дисплазію (CIN 3) і кондиломатоз вульви та шкіри промежини на фоні інфікування вірусом папіломи людини, з приводу чого отримала комплексне лікування — радіохвильове видалення кондилом, радіохвильову конізацію та лазерну деструкцію шийки матки, курси противірусного лікування та імунотерапії. У 2014 р. пройшла курс вакцинації проти високоонкогенних типів вірусу папіломи людини (Церварікс, 3 бустерні дози внутрішньом'язово). Після лікування пацієнтка знята з диспансерного обліку з діагнозом CIN 3, патології з боку органів жіночої репродуктивної системи не виявлено. З 2014 р. проходить диспансеризацію 1 раз на рік з ультразвуковим контролем органів малого таза, молочних залоз, щитоподібної залози, визначенням рівня CA125, HE4, індексу Roma у динаміці.

Молекулярно-генетичний аналіз клітин периферичної крові дочки пробанда виявив аналогічну такій у РМЗ пробанда делецію 6174delT у гені *BRCA2* у гетерозиготному стані (рис. 3).

Рис. 3. Електрофореграма 6174delT *BRCA2*. Розподіл продуктів ампліфікації, згідно з яким у периферичній крові дочки пробанда виявлено делецію 6174delT *BRCA2* у гетерозиготному стані (лунка 4). Примітка: М — маркер молекулярної маси

Таким чином, визначено спадковий РМЗ у матері та її двох дочок, первинно-множинні пухлини у матері та однієї з дочок (пробанда), що асоційовані з мутацією 6174delT у гені *BRCA2*. Встановлено також, що дочка пробанда є носієм аналогічної мутації. Одержані дані вказують на значення мутації 6174delT у гені *BRCA2* у розвитку спадкових і первинно-множинних пухлин у цій родині. Враховуючи, що мутації в генах *BRCA1* та *BRCA2* асоційовані з розвитком не тільки РМЗ і РЯ, а й раку передміхурової залози, підшлункової залози, шлунка [3], було б доцільно провести молекулярно-генетичне дослідження периферичної крові і сина пробанда.

Загалом з урахуванням описаного спектру злоякісних пухлин, виникнення яких може бути пов'язане з мутаціями в генах *BRCA* [3], пацієнтки з онкогінекологічною патологією потребують ширшого диспансерного спостереження та проведення профілактичних заходів для запобігання розвитку раку не тільки в органах жіночої репродуктивної системи.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, *et al.*** A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. Nat Med 2001; **7**: 552–6.

2. **Petrucelli N, Daly MB, Feldman GL.** Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. Gen Med 2010; **12**: 245–59.

3. **Cavanagh H, Rogers KMA.** The role of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in prostate, pancreatic and stomach cancers. Hered Cancer Clin Pract 2015; **13**. doi:10.1186/s13053–015–0038-x.

MUTATION 6174delT IN *BRCA2* GENE IN FAMILY WITH TUMOR PATHOLOGY AGGREGATION (CLINICAL CASE)

O.V. Paliychuk, Z.I. Rossokha, F.M. Galkin, L.Z. Polishchuk

Summary. ***Aim:*** *the results of clinical, clinico-genealogical and molecular-genetic investigation of patients from family with tumor aggregation in two generations were analyzed.* ***Object and methods:*** *the data on proband, her parents and sisters were included to the analyses. Molecular-genetic study was performed using the method of multiplex allele specific PCR for identification of mutations 5382insC and 185delAG in BRCA1 gene and 6174delT in BRCA2 gene in proband's tumor tissue and her daughter's peripheral blood.* ***Results:*** *we found that the proband have had bilateral breast cancer (BC) and ovarian cancer, one of the proband's sisters — BC, proband's mother — primary multiple tumors (BC and endometrial cancer) and proband's father — lung cancer. Molecular-genetic investigation of proband's BC histologic slides showed the absence of mutations 5382insC and 185delAG in BRCA1 gene, and deletion of 6174delT in BRCA2 gene in heterozygote state. Analogic deletion in that gene but in gomozygote state was found both in proband's ovarian cancer and in peripheral blood of practically healthy proband's daughter.* ***Conclusion:*** *obtained data underline the significance of germinal 6174delT mutation in BRCA2 gene in hereditary and multiple tumors in this family. The knowledge of family history and genetic testing are important to clarify genetic status among family members with oncological pathology.*

Key Words: *BRCA2* 6174delT mutation, hereditary breast cancer, ovarian cancer, multiple tumors, pedigree.

Адреса для листування:
Палійчук О.В.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України
E-mail: oncology@2upost.com

Одержано: 23.10.2015