



Оригинальная статья

Алгоритм молекулярно-генетического обследования для выявления наследственного BRCA-ассоциированного рака молочной железы

Снигирева Г.П.¹ • Румянцева В.А.² • Новикова Е.И.¹ • Новицкая Н.Н.¹ • Тельшева Е.Н.¹ • Хазинс Е.Д.¹ • Шайхаев Е.Г.¹

Актуальность. Около 30% случаев наследственного рака молочной железы (РМЖ) обусловлено мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Отсутствие в России программ обязательного генетического скрининга наследственного BRCA-ассоциированного РМЖ, а также алгоритма молекулярно-генетического обследования не позволяет в полной мере проводить необходимые профилактические, диагностические и лечебные мероприятия. **Цель** – разработка алгоритма молекулярно-генетического обследования больных РМЖ для повышения эффективности выявления наследственного характера заболевания. **Материал и методы.** Работа основана на анализе результатов молекулярно-генетического тестирования 3826 больных РМЖ в возрасте от 22 до 90 лет, которые прошли обследование и лечение в ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России в период с 2010 по 2016 г. На первом этапе с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени определяли распространенные в российской популяции герминальные мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*, на втором этапе методом секвенирования «нового поколения» (англ. next generation sequencing – NGS) осуществляли поиск редких генетических вариантов в этих генах. **Результаты.** Исследование методом ПЦР в режиме реального времени (первый этап) показало: частота наиболее характерных для

русской популяции мутаций в гене *BRCA1*, ассоциированных с риском развития РМЖ, составила 3,5% (132 из 3826 пациентов с РМЖ); ни одного носителя мутаций в гене *BRCA2* не выявлено. На основании анализа данных анкетирования и первичной медицинской документации из общей когорты обследованных была сформирована группа из 717 человек, в которую вошли пациенты с клиническими признаками наследственного заболевания (КПНЗ). В этой группе мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* были выявлены у 126 человек, что составило 17,6%. На втором этапе методом NGS в группе из 193 больных РМЖ с КПНЗ и отсутствием характерных для российской популяции мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* были найдены редкие патогенные мутации в этих генах у 27 человек, то есть у 14%. Суммируя полученные данные, можно заключить, что не менее 30% больных РМЖ с КПНЗ имеют наследственные мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*. На основании полученных данных разработан алгоритм молекулярно-генетического обследования больных РМЖ для выявления наследственного характера заболевания. **Заключение.** Выявленная в настоящей работе высокая частота мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных РМЖ с КПНЗ подтверждает необходимость генетического тестирования наследственного заболевания. Информация о наследственном характере заболевания

позволит вносить существенные изменения в тактику проводимого лечения, применяя персонализированный подход. Динамическое наблюдение пациентов с наследственным РМЖ и профилактика возникновения новых случаев РМЖ и других онкологических заболеваний (рак яичника, желудка, поджелудочной железы, предстательной железы, меланомы) у их родственников – носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* – должны осуществляться мультидисциплинарной командой (маммологи, гинекологи, онкологи, медицинские генетики, химиотерапевты, психотерапевты).

Ключевые слова: наследственный рак молочной железы, гены *BRCA1* и *BRCA2*, секвенирование «нового поколения» (NGS), медико-генетическое консультирование

Для цитирования: Снигирева ГП, Румянцева ВА, Новикова ЕИ, Новицкая НН, Тельшева ЕН, Хазинс ЕД, Шайхаев ЕГ. Алгоритм молекулярно-генетического обследования для выявления наследственного BRCA-ассоциированного рака молочной железы. Альманах клинической медицины. 2019;47(1):54–65. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-002.

Поступила 13.09.2018; принята к публикации 16.01.2019; опубликована 06.02.2019

Ежегодный рост заболеваемости раком молочной железы (РМЖ) наблюдается в большинстве регионов мира [1], включая Россию. Так, в 2015 г. в стране было зарегистрировано 66,4 тыс. новых случаев РМЖ, в 2016 – 68,2 тыс., в 2017 – 70,6 тыс. [2]. Отмечается также тенденция «омоложения» РМЖ [3]. В России за десятилетний период (2002–2012) частота его развития у женщин в возрастной группе

19–39 лет выросла на 34% [4]. Ряд авторов это связывают с разработкой и внедрением скрининговых программ [3, 5–7].

На долю генетически обусловленных форм РМЖ приходится от 5 до 10% случаев этого мультифакторного заболевания, что указывает на необходимость раннего выявления женщин с наследственной предрасположенностью к нему [8]. Механизм развития наследственного РМЖ



обусловлен мутациями в определенных, специфических для данного заболевания, генах [9]. К ним относятся гены, вовлеченные в процесс репарации, регуляции клеточного цикла, апоптоза, дифференцировки клеток, то есть отвечающие за поддержание стабильности генома (*BRCA1/2*, *CHEK2*, *TP53*, *STK11*, *PTEN*, *ATM*, *BRIP1*, *PALB2* и др.). Нарушения в этих генах определяют риск возникновения заболевания у их носителей и, соответственно, предрасположенность к развитию РМЖ [10].

BRCA-ассоциированный РМЖ (OMIM 604370) – заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования – составляет до 50% всех генетически обусловленных форм РМЖ [8, 11, 12]. Для него характерен ранний дебют, а также более агрессивное, чем при других формах, течение: около 80% *BRCA1*-ассоциированных опухолей молочной железы при иммуногистохимическом исследовании характеризуются тройным негативным иммунофенотипом (ER-, PR-, HER2/неu-), наиболее часто выявляется базальный фенотип опухоли. У больных РМЖ – носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* – значительно повышен риск развития контралатерального РМЖ, рака яичников, меланомы, толстой кишки, желудка и поджелудочной железы [13–15]. Гены *BRCA1* и *BRCA2* кодируют аминокислотные последовательности ядерных белков, которые участвуют в регуляции восстановления ДНК и деления клеток [11, 16]. В интактном (не мутантном) состоянии оба гена выступают в качестве супрессоров опухоли и обеспечивают целостность генома. Кроме того, белковые продукты генов репрессируют транскрипционную функцию гена рецептора эстрогенов, сдерживая, таким образом, избыточную пролиферацию клеток молочной железы и других эстрогензависимых органов, в частности, при половом созревании и беременности. Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* приводят к повышению уровня хромосомной нестабильности в клетках, что может способствовать их опухолевой трансформации. Сегодня известно более 1000 различных мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2*, ассоциированных с РМЖ [17, 18].

В ряде стран Западной Европы, а также в Канаде и США скрининговые программы по выявлению наследственной предрасположенности к РМЖ утверждены на государственном уровне и успешно проводятся уже не одно десятилетие, охватывая более 70% женского населения [5, 6, 19]. В Российской Федерации такой общегосударственной программы пока не существует. Что касается регионов, сегодня наиболее обширная скрининговая программа по ранней диагностике РМЖ проводится в Москве при поддержке городского

департамента здравоохранения в рамках программы по ранней диагностике онкологических заболеваний «Я выбираю здоровое будущее». Эта программа нацелена на возрастную группу 40–60 лет, что для случаев наследственного РМЖ чаще всего бывает поздно. Подчеркнем: обнаружение наследственного характера заболевания у онкологических больных имеет огромное значение, так как позволяет внести существенные изменения в тактику проводимого лечения, применяя персонализированный подход: определить объем и радикальность хирургического лечения, возможность подбора таргетной химиотерапии, а также необходимость одновременного использования методики хирургического лечения и профилактической контралатеральной мастэктомии. Точная генетическая идентификация формы наследственного РМЖ с последующими персонализированными вариантами терапии уменьшает смертность от РМЖ на 90% [20]. Это дает основания рассматривать генетическое тестирование наследственного РМЖ в качестве одного из важнейших инструментов повышения эффективности лечения.

Учитывая имеющиеся сведения о частоте встречаемости носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* в российской популяции (1:800–1:1000) [21], численность этого контингента только в Москве может составить от 5 до 7 тыс. человек. Отсутствие центра наблюдений для здоровых носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, программ обязательного скрининга этой группы пациентов, а также алгоритма молекулярно-генетического обследования для выявления наследственного РМЖ не позволяет в полной мере проводить профилактические, диагностические и лечебные мероприятия.

В этой связи нашей целью была разработка алгоритма молекулярно-генетического обследования больных РМЖ для повышения эффективности выявления наследственного характера заболевания.

Материал и методы

Работа основана на анализе результатов молекулярно-генетического тестирования 3826 больных РМЖ в возрасте от 22 до 90 лет (средний возраст манифестации заболевания составил 58 лет), которые в период с 2010 по 2016 г. проходили обследование и лечение в ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России.

Критерием включения в исследование был диагноз РМЖ, не включения – отказ от молекулярно-генетического тестирования. Все вошедшие в исследование пациенты подписали информиро-

Снигирева Галина Петровна – д-р биол. наук, заведующая лабораторией молекулярной биологии и цитогенетики¹
✉ 117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, 86, Российская Федерация.
Тел.: +7 (495) 334 92 88.
E-mail: sni_gal@mail.ru

Румянцова Виктория Алексеевна – канд. мед. наук, врач-генетик лаборатории медицинской генетики²

Новикова Екатерина Ивановна – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной биологии и цитогенетики¹

Новицкая Наталия Николаевна – инженер лаборатории молекулярной биологии и цитогенетики¹

Тельшева Екатерина Николаевна – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной биологии и цитогенетики¹

Хазинс Ева Давидовна – инженер лаборатории молекулярной биологии и цитогенетики¹

Шайхаев Евгений Гаджирамазанович – ст. науч. сотр. лаборатории молекулярной биологии и цитогенетики¹

¹ ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России; 117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, 86, Российская Федерация

² ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»; 119991, г. Москва, Абрикосовский пер., 2, Российская Федерация

ванное согласие на проведение молекулярно-генетического исследования и хранение биологического материала, а также заполнили специальную анкету, которая включала подробную информацию о наличии в семье родственников с онкологическими заболеваниями, в первую очередь РМЖ и рака яичников.

Проведение данного исследования было одобрено этическим комитетом ФГБУ «РНЦПР» Минздрава России (протокол № 4 от 14.04.2010).

На первом этапе всем пациентам было проведено молекулярно-генетическое исследование методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени для выявления распространенных в российской популяции мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, ассоциированных с риском развития РМЖ и рака яичников.

На втором этапе из общей группы больных сформирована группа, руководствуясь следующими критериями включения: 1) отсутствие выявляемых на первом этапе распространенных в российской популяции мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*; 2) наличие клинических признаков наследственного заболевания (КПНЗ), таких как молодой возраст манифестации заболевания (до 50 лет), наличие первично-множественных опухолей (РМЖ и/или рак яичника), онкологическиотягощенный семейный анамнез (наличие родственников первой и/или второй степени родства с диагнозом РМЖ и/или рака яичников), трижды негативный фенотип опухоли. Пациентам этой группы было проведено молекулярно-генетическое исследование методом секвенирования «нового поколения» (англ. next generation sequencing – NGS) для выявления редких мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, ассоциированных с риском развития РМЖ и рака яичников.

Метод ПЦР в режиме реального времени. Для поиска распространенных в российской популяции мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* – 185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAАА, 3875delGTCT, 300T>G, 2080delA (*BRCA1*) и 6174delT (*BRCA2*) – использовали метод ПЦР в режиме реального времени. Выделение геномной ДНК проводили из 100 мкл периферической крови на магнитных шариках с помощью наборов М-Сорб («Синтол», Россия) согласно протоколу производителя. Для проведения ПЦР в режиме реального времени использовали набор реагентов ОнкоГенетика BRCA (ООО «НПФ ДНК-Технология», Россия) и детектирующий амплификатор ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Все этапы анализа выполняли согласно инструкции, предоставленной фирмой-производителем.

Метод секвенирования «нового поколения» (NGS). Для проведения молекулярно-генетического исследования методом NGS ДНК выделяли из 200 мкл крови на колонках с использованием наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit («Qiagen», Германия), позволяющих получать ДНК с концентрацией не менее 10 нг/мкл согласно протоколу производителя. Библиотеки были подготовлены с помощью панели TruSight Cancer («Illumina», США) и реагентов для подготовки библиотек TruSight Rapid Capture («Illumina», США) с использованием методики селективного захвата участков ДНК. Пробоподготовку выполняли по стандартному протоколу, предоставленному производителем. Секвенирование проводили на приборе MiSeq («Illumina», США) методом парно-концевого чтения (2×151 пар оснований) со средним 100-кратным покрытием с использованием реагентов MiSeq Reagent Kits v2 («Illumina», США). Полученные после секвенирования данные были автоматически обработаны с помощью программного обеспечения, установленного на приборе, для исключения ридов с низким качеством прочтения, выравнивания относительно референсной последовательности генома человека (hg19), а также идентификации полученных генетических вариантов. Анализ полученных с прибора данных (в текстовом формате) проводился на персональном компьютере с использованием программного обеспечения Variant Studio 2.2 («Illumina», США), которое позволяет аннотировать и классифицировать выявленные генетические нарушения. Для интерпретации выявленных генетических вариантов использовались базы данных dbSNP (The Single Nucleotide Polymorphism database), ClinVar (Clinical Variation), HGMD (Human Gene Mutation Database), BIC (Breast Cancer Information Core), OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). Частоту аллелей оценивали с помощью баз данных проектов ExAC (Exome Aggregation Consortium) и 1000G (1000 Genomes Project), а функциональную значимость найденных генетических вариантов – с использованием программ предсказания патогенности CADD (Combined Annotation Dependent Depletion), PolyPhen (Polymorphism Phenotyping) и Sift (Sorting Intolerant from Tolerant). Полученные варианты интерпретировали согласно классификации, предложенной Американским колледжем медицинской генетики (American College of Medical Genetics and Genomics – ACMG). Варианты классифицировались как патогенные и вероятно патогенные, а также как варианты с неизвестным клиническим значением с учетом информации в доступных базах данных (упомянуты выше) и критериев для оценки



генетических вариантов, предложенных ACMG. Варианты, не имеющие клинического значения, в данной работе не рассматривались.

Секвенирование по Сэнгеру. Полученные методами ПЦР в режиме реального времени и NGS генетические варианты были верифицированы методом секвенирования по Сэнгеру. Для проведения ПЦР использовали реактивы GenPak PCR Core (ООО «Лаборатория Изоген», Россия) и праймеры, подобранные с помощью программы Primer3 и синтезированные в компании «Синтол» (Россия). Очистку реакционной смеси (ПЦР) проводили с помощью наборов Cleanup Mini (ЗАО «Евроген», Россия). Для реакции Сэнгера применяли реактивы BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США). Секвенирование проводили на приборе ABI PRISM 3100 (“Applied Biosystems”, США). Все этапы исследования выполняли согласно инструкциям, предоставленным фирмами-производителями.

Статистический анализ. Размер выборки предварительно не рассчитывался. Данные анализировали с помощью StatSoft Statistica 10.0 и представляли как среднее арифметическое и стандартное отклонение среднего ($M \pm SD$). Для сравнения частот мутантных аллелей в разных группах пациентов применяли анализ таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 с поправкой Йейтса и двустороннего точного критерия Фишера. Различие частот считалось статистически значимым при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На первом этапе было проведено молекулярно-генетическое обследование 3826 больных РМЖ методом ПЦР в режиме реального времени для поиска распространенных в российской популяции мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*: 185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 300T>G, 2080delA (*BRCA1*) и 6174delT (*BRCA2*). У 132 (3,5%) пациентов были выявлены мутации в гене *BRCA1*, что значительно превышает популяционную частоту носителей мутаций (1:800–1:1000) [21]. Это вполне ожидаемо, поскольку все обследованные пациенты имели диагноз РМЖ.

Спектр и частота выявленных мутаций в гене *BRCA1* в общей группе больных РМЖ приведены в табл. 1. Известно, что спектр выявляемых мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* достаточно широк и варьирует в зависимости от этнической принадлежности изучаемой популяции. В славянской популяции при наследственных формах РМЖ наиболее часто встречается мутация 5382insC в гене *BRCA1* [10, 12, 13]. Этот генетический вариант

преобладал и в нашей выборке, которая не была отобрана по национальной принадлежности. Его частота среди всей обследованной группы составила 2,5% (96 из 3826). Остальные мутации встретились значительно реже – с частотой менее 0,5%. Ни у одного из обследованных больных РМЖ не была найдена мутация 3875delGTCT в гене *BRCA1*. Не было выявлено также ни одного носителя мутаций в гене *BRCA2*.

С учетом рекомендаций Европейского общества медицинской онкологии (European Society for Medical Oncology – ESMO) [19] и Национальной онкологической сети США (National Comprehensive Cancer Network – NCCN) [6], а также на основании анализа данных анкетирования и первичной медицинской документации из общей когорты ($n = 3826$) были выделены в отдельную группу 717 больных РМЖ с одним или несколькими КПНЗ. Частота мутаций в гене *BRCA1* в сформированной группе больных с КПНЗ оказалась в 5 раз выше, чем в общей группе, – 17,6% ($n = 126$), при этом частота встречаемости мутации 5382insC составила 12,6% ($n = 91$). Шесть больных РМЖ с выявленными наиболее распространенными в российской популяции мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2* не вошли в сформированную группу с КПНЗ в связи с отсутствием достоверной информации о семейном онкологическом анамнезе.

На втором этапе было проведено молекулярно-генетическое обследование 193 больных РМЖ методом высокопроизводительного секвенирования (NGS). В эту группу были включены пациенты с КПНЗ, у которых на первом этапе исследования не были выявлены распространенные в России мутации в исследуемых генах. У 27 (14%) больных были найдены редкие патогенные мутации: 10 нонсенс-мутаций, 7 вариантов, приводящих к сдвигу рамки считывания, 4 варианта в сайте сплайсинга и 1 миссенс-вариант в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Спектр и частота выявленных генетических вариантов отражены в табл. 2. У 13 из 27 больных (6,7%) найдены мутации в гене *BRCA1*, а у 14 из 27 (7,2%) – в гене *BRCA2*. С наибольшей частотой встретилась мутация с.3607C>T в гене *BRCA1*, которая была найдена у 3 больных. Эта мутация, впервые описанная в 1994 г., характеризуется высоким индивидуальным риском развития РМЖ и рака яичников [22, 23]. Дважды встретились мутации с.9098_9090insA, с.1301_1304delAAAG и с.4689C>G в гене *BRCA1*. Информация о выявленных патогенных вариантах содержится в генетических базах данных (ExAC, 1000G).

Кроме мутаций с известным клиническим значением мы проанализировали варианты

Таблица 1. Спектр и частота распространенных в российской популяции мутаций в гене *BRCA1* в обследованной группе больных раком молочной железы (метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени)

Ген	Название мутации (номенклатура VIC)	Количество пациентов с мутацией в общей группе (n = 3826), абс.	Частота мутации (M ± SD), %	Количество пациентов с мутацией в группе с КПНЗ (n = 717), абс.	Частота мутации (M ± SD), %
<i>BRCA1</i>	5382insC	96	2,5 ± 0,3	91	12,6 ± 1,2*
	4153delA	4	0,1 ± 0,1	4	0,6 ± 0,3*
	300T>G	8	0,2 ± 0,1	8	1,1 ± 0,4*
	2080delA	8	0,2 ± 0,1	8	1,1 ± 0,4*
	185delAG	10	0,3 ± 0,1	9	1,3 ± 0,4*
	3819delGTAAA	6	0,2 ± 0,1	6	0,8 ± 0,3*
	3875delGTCT	–	–	–	–
Всего		132	3,5 ± 0,3	126	17,6 ± 1,4*

КПНЗ – клинические признаки наследственного заболевания

* Статистически значимые различия с частотой мутаций в общей группе больных раком молочной железы (p < 0,05)

с неизвестным клиническим значением в генах *BRCA1* и *BRCA2*. У 6 больных были обнаружены гетерозиготные миссенс-варианты, встречающиеся с низкой частотой среди разных популяций (табл. 3). Все варианты с неизвестным клиническим значением в генах *BRCA1* и *BRCA2* были тщательно проанализированы. Показано, что выявленные варианты с.7522G>A, с.7868A>G, с.8524C>T в гене *BRCA2* приводят к потере функций кодируемых белков, а результаты различных программ предсказания свидетельствуют об их патогенности. Y. Zhang и соавт. установили связь варианта с.7522G>A с повышением риска развития РМЖ в 16,5 раза [24]. Генетический вариант с.8524C>T в нашем исследовании был обнаружен у 2 больных РМЖ, на основании чего мы предположили, что эта миссенс-мутация является патогенной [18]. В некоторых генетических базах данных и вариант с.7868A>G присутствует с пометкой «патогенный» [17, 25, 26]. Связывать выявленные генетические варианты с.3541G>A (*BRCA1*), с.1243G>A (*BRCA1*), с.9934A>G (*BRCA2*) с повышенным риском развития РМЖ, по-видимому, не совсем корректно, так как результаты программ предсказания патогенности свидетельствуют о сохранении функций кодируемых белков. У одной из обследованных нами больных РМЖ с выявленным генетическим вариантом с.9934A>G в гене *BRCA2* была обнаружена патогенная мутация с.3607C>T в гене *BRCA1*. У этой пациентки был верифицирован первично-множественный метакронный рак. Гистологический диагноз – инфильтративно-протоковый рак третьей

степени злокачественности, трижды негативный фенотип опухоли. Диагноз установлен в 59 лет, в семье есть случаи онкологических заболеваний (РМЖ и рак яичников) у родственников 1 и 2-й линии родства. Основываясь на результатах проведенного исследования, а также имеющихся в литературе данных [17], можно предположить, что выявленные у больных РМЖ генетические варианты с неизвестным клиническим значением могут быть одной из причин развития заболевания.

К настоящему времени клинические рекомендации по профилактике и лечению наследственного РМЖ разработаны только для носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* [10, 13]. В клинической практике спектр анализируемых мутаций ограничен выявлением наиболее распространенных вариантов. Однако информация о мутациях в других регионах этих генов длительное время была недоступна в связи с большим размером генов *BRCA1* и *BRCA2*. Исследования, позволяющие выявлять широкий спектр мутаций по всей длине гена, проводились лишь в небольшом числе специализированных лабораторий в мире. В России такая диагностика была недоступна в силу высокой стоимости и трудоемкости. И только после внедрения в практику новых высокопроизводительных молекулярно-генетических методов (в том числе NGS) появилась реальная возможность проводить поиск и идентификацию новых клинически значимых вариантов в генах *BRCA1* и *BRCA2*. В этой связи все больные, имеющие КПНЗ, но у которых отсутствуют распространенные в российской



Таблица 2. Спектр и частота редких патогенных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* в обследованной группе больных раком молочной железы (n = 193) (метод NGS)

Ген	Название мутации (номенклатура HGVS)	Характеристика мутации	Количество пациентов с мутацией, абс.	Частота мутации, %
<i>BRCA1</i>	c.4327C>T	нонсенс-мутация	1	0,5
	c.4752C>G	нонсенс-мутация	2	1,1
	c.5531-1G>A	мутация в сайте сплайсинга	1	0,5
	c.3607C>T	нонсенс-мутация	3	1,6
	c.5224C>T	нонсенс-мутация	1	0,5
	c.4258C>T	нонсенс-мутация	1	0,5
	c.1687C>T	нонсенс-мутация	1	0,5
	c.4165_4166delAG	делеция со сдвигом рамки считывания	1	0,5
	c.3257T>G	нонсенс-мутация	1	0,5
	c.5152+1G>T	мутация в сайте сплайсинга	1	0,5
<i>BRCA2</i>	c.8002A>T	нонсенс-мутация	1	0,5
	c.6070C>T	нонсенс-мутация	1	0,5
	c.6997_6998insT	инсерция со сдвигом рамки считывания	1	0,5
	c.3748_3749insA	инсерция со сдвигом рамки считывания	1	0,5
	c.5718_5719delCT	делеция со сдвигом рамки считывания	1	0,5
	c.1301_1304delAAAG	делеция со сдвигом рамки считывания	2	1,1
	c.9117G>A	мутация в сайте сплайсинга	1	0,5
	c.9089_9090insA	инсерция со сдвигом рамки считывания	2	1,1
	c.632-1G>A	мутация в сайте сплайсинга	1	0,5
	c.4111C>T	нонсенс-мутация	1	0,5
c.7254_7255delAG	делеция со сдвигом рамки считывания	1	0,5	
c.7007G>A	миссенс-мутация	1	0,5	
Всего			27	14 ± 2,5

популяции мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*, должны быть направлены на полное исследование генов *BRCA1* и *BRCA2* методом NGS.

Принимая во внимание полученные в нашем исследовании данные, был разработан алгоритм молекулярно-генетического обследования больных для выявления наследственного

BRCA-ассоциированного РМЖ, который включает следующие основные этапы (рис. 1):

- медико-генетическое консультирование больных (изучение семейного онкологического анамнеза);
- проведение молекулярно-генетического исследования всем больным РМЖ для выявления



Таблица 3. Спектр редких вариантов с неизвестным клиническим значением в генах *BRCA1* и *BRCA2* в обследованной группе больных раком молочной железы (n = 193) (метод NGS)

Ген	Название генетического варианта (номенклатура HGVS)	Характеристика мутации	Количество пациентов с мутацией, абс.	Средняя частота варианта среди разных популяций, %	
				ExAC	1000G
<i>BRCA1</i>	c.3541G>A	миссенс-мутация	1	0,009	0,04
	c.1243G>A	миссенс-мутация	1	0,004	0
<i>BRCA2</i>	c.9934A>G	миссенс-мутация	1	≤ 0,001	0
	c.7522G>A	миссенс-мутация	1	0,01	0
	c.7868A>G	миссенс-мутация	1	0	0
	c.8524C>T	миссенс-мутация	1	0	0

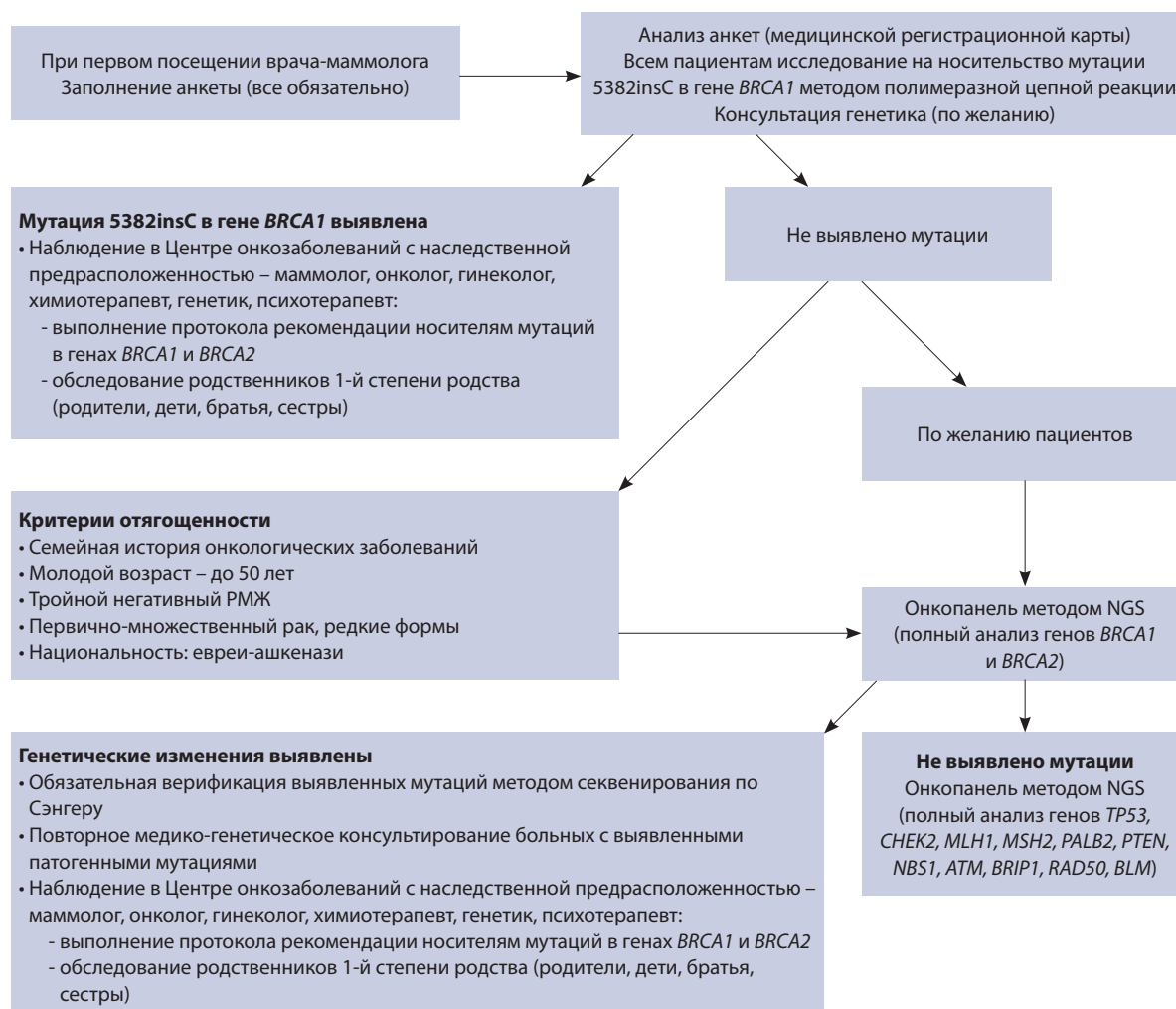


Рис. 1. Алгоритм молекулярно-генетического обследования для выявления наследственного *BRCA*-ассоциированного рака молочной железы (РМЖ)



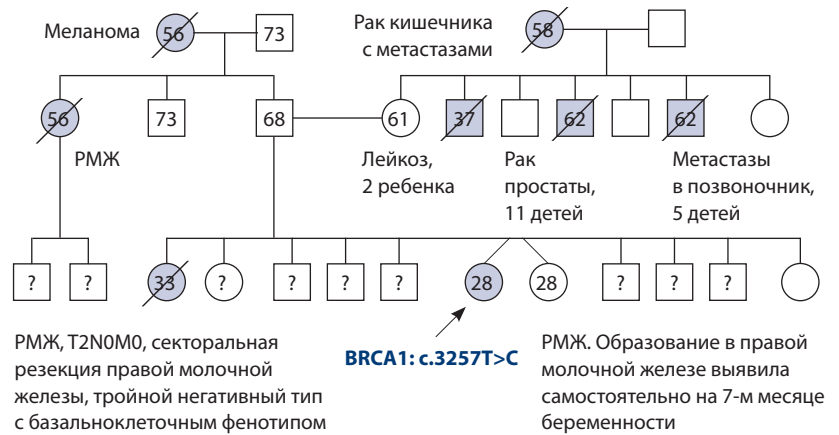
распространенной в популяции мутации 5382insC в гене *BRCA1* методом ПЦР в режиме реального времени;

- при отсутствии у больных РМЖ мутации 5382insC в гене *BRCA1*, но наличии у них КПНЗ целесообразно проведение молекулярно-генетического исследования методом NGS с использованием панели, позволяющей секвенировать всю кодирующую часть генов *BRCA1* и *BRCA2*;
- обязательная верификация выявленных мутаций методом секвенирования по Сэнгеру;
- повторное медико-генетическое консультирование больных с выявленными мутациями;
- в случае обнаружения мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* проведение молекулярно-генетического обследования родственников (при достижении совершеннолетия) для выявления аналогичных мутаций методом секвенирования по Сэнгеру с последующей консультацией врача-генетика.

Важность внедрения в клиническую практику предложенного алгоритма молекулярно-генетического обследования больных для определения наследственного *BRCA*-ассоциированного РМЖ можно проиллюстрировать на примере следующего **клинического наблюдения**.

Пробанд, пациентка В., возраст 28 лет, с отягощенным семейным анамнезом (рис. 2). Методом NGS с последующей верификацией методом секвенирования по Сэнгеру было выявлено генетическое изменение: с.3257T>C (*BRCA1*). Это редкая нонсенс-мутация, приводящая к синтезу короткого нефункционального белка, ассоциированная с высоким риском развития РМЖ и рака яичников (рис. 3, 4). Ранее сестре пробанда в другом медицинском учреждении не был поставлен диагноз наследственного РМЖ, так как ни одна из распространенных в российской популяции мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* (185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAG, 3875delGTCT, 300T>G, 2080delA и 6174delT) не была обнаружена при тестировании методом ПЦР. Сестра пациентки В. умерла в возрасте 33 лет.

Таким образом, с помощью диагностической панели, включающей характерные для российской популяции мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*, ассоциированные с риском развития РМЖ, в нашей работе была протестирована группа из 3826 больных. Частота выявленных мутаций в этой группе составила 3,5%. В группе больных РМЖ с КПНЗ (n = 717), сформированной из общего числа обследованных, частота характерных для российской популяции мутаций оказалась в 5 раз выше – 17,6%. С помощью метода высокопроизводительного секвенирования (NGS) дополнительно были



Частых мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* не выявлено!

Рис. 2. Родословная пациентки В. с наследственным раком молочной железы (PMЖ), 28 лет, патогенная мутация с.3257T>C в гене *BRCA*, выявленная методом NGS

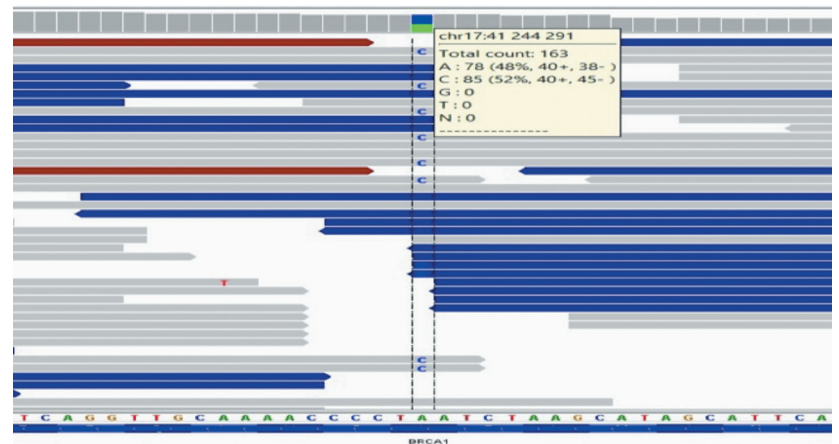


Рис. 3. Фрагмент секвенирования последовательности гена *BRCA1* методом NGS (прибор MiSeq ("Illumina", США) у пациентки В. с наследственным раком молочной железы. Положение замены с.3257T>C в гене *BRCA1* выделено линиями

выявлены редкие патогенные мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* еще у 14% обследованных из группы больных РМЖ с КПНЗ и отсутствием характерных для российской популяции мутаций (n = 193). На основании полученных данных можно заключить, что не менее 30% больных РМЖ с КПНЗ имеют наследственные мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*.

Мы показали, что применение технологии NGS упрощает анализ таких протяженных генов, как *BRCA1* и *BRCA2*. Однако при проведении молекулярно-генетического исследования необходимо учитывать ограничения данного метода, а именно невозможность полного покрытия всего гена или неравномерность прочтения отдельных участков. Широкое применение методов

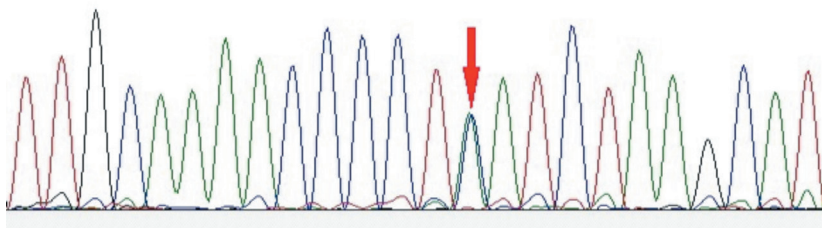


Рис. 4. Фрагмент секвенирования последовательности гена *BRCA1* по методу Сэнгера (подтверждающая диагностика) у пациентки В. с наследственным раком молочной железы. Визуализация в программе Chromas. Патогенная мутация с.3257Т>С в гене *BRCA1* указана стрелкой

высокопроизводительного секвенирования приводит к выявлению большого числа неописанных вариантов, квалификация которых требует большой осторожности, как и вынесение заключения о связи выявленного генетического варианта с заболеванием. Очень важно аккуратно анализировать вновь выявленные варианты, так как не все аминокислотные замены являются мутациями. Подтверждение всех найденных патогенных генетических вариантов должно проводиться с помощью секвенирования по Сэнгеру – единственного сертифицированного метода для клинической диагностики.

Предложенный нами алгоритм молекулярно-генетического обследования для выявления наследственного *BRCA*-ассоциированного РМЖ позволяет диагностировать заболевание на ранней стадии и проводить необходимые профилактические и лечебные мероприятия, что будет способствовать повышению эффективности лечения и снижению смертности при данной онкопатологии.

Полученные в работе результаты молекулярно-генетического исследования указывают на необходимость создания единого регистра всех выявленных вариантов в генах *BRCA1* и *BRCA2* у российских больных с наследственным РМЖ (патогенных замен, неописанных замен, замен с неизвестным клиническим значением), который поможет в будущем разрабатывать персонализированные протоколы лечения и консультирования таких больных.

Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена в рамках выполнения Государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 115040640033.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Г.П. Снигирева – концепция и дизайн статьи, редактирование текста, утверждение итогового варианта текста рукописи; В.А. Румянцев – формирование групп пациентов, набор и обработка

Заключение

Важность развития программ ранней диагностики онкологических заболеваний практически никем не оспаривается, однако широкое внедрение методик генетического скрининга вызывает серьезные дискуссии не только в профессиональной среде, но и среди населения. Разработка программы, в которой генетическое тестирование станет повсеместно рутинной процедурой, чрезвычайно необходима, так как выявление герминальных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* дает возможность прогнозировать заболевание задолго до его возникновения и вовремя принять необходимые меры для профилактики, включая молекулярно-направленную терапию и превентивные операции. Аутосомно-доминантный тип наследования при *BRCA*-ассоциированном РМЖ позволяет ожидать накопления заболеваний в семье, что требует выполнения каскадного семейного скрининга. Это предполагает разработку алгоритма обследования, при котором экономическая и медицинская эффективность применяемых методик должна учитывать социально-этические факторы, связанные с необходимостью проводить углубленную диагностику здоровых людей, не создавая при этом стрессовую ситуацию и не провоцируя канцерофобию [27]. Программа должна обязательно включать четкие показания и рекомендации для врачей общей практики и онкологов.

Выявленная в проведенном нами исследовании высокая частота мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных РМЖ подтверждает необходимость тотального генетического скрининга в этой группе. Динамическое наблюдение пациентов с наследственным РМЖ и профилактика возникновения новых случаев онкозаболевания у их родственников – носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* – должны осуществляться мультидисциплинарной командой (маммологи, гинекологи, онкологи, медицинские генетики, химиотерапевты, психотерапевты). ©

клинического материала, написание текста; Е.И. Новикова – формирование групп пациентов, набор клинического материала, сбор и обработка материалов, анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста; Н.Н. Новицкая – сбор и обработка материалов клинического исследования; Е.Н. Тельшева – сбор и обработка материалов, анализ и интерпретация результатов исследования; Е.Д. Хазинс – набор клинического материала, статистическая обработка данных; Е.Г. Шайхаев – анализ клинико-экспериментальных результатов исследования. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.



Литература

- World Health Organization. Cancer. Early diagnosis and screening. Breast cancer [Internet]. Available from: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>.
- Каприн АД, Старинский ВВ, Петрова ГВ, ред. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2018. 250 с.
- Holford TR, Cronin KA, Mariotto AB, Feuer EJ. Changing patterns in breast cancer incidence trends. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2006;(36): 19–25. doi: 10.1093/jncimonographs/lgj016.
- Рассказова ЕА, Рожкова НИ. Скрининг для ранней диагностики рака молочной железы. Исследования и практика в медицине. 2014;1(1):45–51. doi: 10.17709/2409-2231-2014-1-1-45-51.
- Bytautas J, Dobrow M, Sullivan T, Brown A. Accountability in the ontario cancer services system: a qualitative study of system leaders' perspectives. *Health Policy*. 2014;10(Spec issue):45–55. doi: 10.12927/hcpol.2014.23919.
- National Comprehensive Cancer Network. NCCN guidelines for detection, prevention, & risk reduction: genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian 2015 [Internet]. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx#detection.
- Ossa CA, Torres D. Founder and recurrent mutations in BRCA1 and BRCA2 genes in Latin American countries: state of the art and literature review. *Oncologist*. 2016;21(7):832–9. doi: 10.1634/theoncologist.2015-0416.
- Parkes A, Arun BK, Litton JK. Systemic treatment strategies for patients with hereditary breast cancer syndromes. *Oncologist*. 2017;22(6):655–66. doi: 10.1634/theoncologist.2016-0430.
- Lynch HT, Snyder C, Lynch J. Hereditary breast cancer: practical pursuit for clinical translation. *Ann Surg Oncol*. 2012;19(6):1723–31. doi: 10.1245/s10434-012-2256-z.
- Имянитов ЕН. Наследственный рак молочной железы. *Практическая онкология*. 2010;11(4):258–66.
- Paul A, Paul S. The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014;19:605–18. doi: 10.2741/4230.
- Brozek I, Cybulska C, Ratajska M, Piatkowska M, Kluska A, Balabas A, Dabrowska M, Nowakowska D, Niwinska A, Pamula-Pilat J, Tecza K, Pekala W, Rembowski J, Nowicka K, Mosor M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Rachtan J, Grzybowska E, Nowak J, Steffen J, Limon J. Prevalence of the most frequent BRCA1 mutations in Polish population. *J Appl Genet*. 2011;52(3):325–30. doi: 10.1007/s13353-011-0040-6.
- Любченко ЛН, Батенева ЕИ, Абрамов ИС, Емельянова МА, Будик ЮА, Тюляндина АС, Крохина ОВ, Воронников ИК, Соболевский ВА, Наседкина ТВ, Портной СМ. Наследственный рак молочной железы и яичников. Злокачественные опухоли. 2013;(2):53–61. doi: 10.18027/2224-5057-2013-2-53-61.
- Shimelis H, LaDuca H, Hu C, Hart SN, Na J, Thomas A, Akinhanmi M, Moore RM, Brauch H, Cox A, Eccles DM, Ewart-Toland A, Fasching PA, Fostira F, Garber J, Godwin AK, Konstantopoulou I, Nevanlinna H, Sharma P, Yannoukakos D, Yao S, Feng BJ, Tiffin Davis B, Lilyquist J, Pesaran T, Goldgar DE, Polley EC, Dolinsky JS, Couch FJ. Triple-negative breast cancer risk genes identified by multigene hereditary cancer panel testing. *J Natl Cancer Inst*. 2018;110(8):855–62. doi: 10.1093/jnci/djy106.
- van der Groep P, van der Wall E, van Diest PJ. Pathology of hereditary breast cancer. *Cell Oncol (Dordr)*. 2011;34(2):71–88. doi: 10.1007/s13402-011-0010-3.
- Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene*. 2006;25(43):5864–74. doi: 10.1038/sj.onc.1209874.
- Yılmaz NK, Karagin PH, Terzi YK, Kahyaoğlu İ, Yılmaz S, Erkaya S, Şahin Fİ. BRCA1 and BRCA2 sequence variations detected with next-generation sequencing in patients with premature ovarian insufficiency. *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 2016;17(2):77–82. doi: 10.5152/jtgga.2016.16035.
- Winter C, Nilsson MP, Olsson E, George AM, Chen Y, Kvist A, Törngren T, Vallon-Christersson J, Hegardt C, Häkkinen J, Jönsson G, Grabau D, Malmberg M, Kristofferson U, Rehn M, Gruvberger-Saal SK, Larsson C, Borg Å, Loman N, Saal LH. Targeted sequencing of BRCA1 and BRCA2 across a large unselected breast cancer cohort suggests that one-third of mutations are somatic. *Ann Oncol*. 2016;27(8): 1532–8. doi: 10.1093/annonc/mdw209.
- Balmaña J, Díez O, Rubio IT, Cardoso F; ESMO Guidelines Working Group. BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*. 2011;22 Suppl 6:vi31–4. doi: 10.1093/annonc/mdr373.
- Domchek SM, Friebel TM, Singer CF, Evans DG, Lynch HT, Isaacs C, Garber JE, Neuhausen SL, Matloff E, Eeles R, Pichert G, Van t'Veer L, Tung N, Weitzel JN, Couch FJ, Rubinstein WS, Ganz PA, Daly MB, Olopade OI, Tomlinson G, Schildkraut J, Blum JL, Rebbeck TR. Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. *JAMA*. 2010;304(9):967–75. doi: 10.1001/jama.2010.1237.
- Любченко ЛН. Генетическое тестирование при наследственном раке молочной железы. *Практическая онкология*. 2014;15(3): 107–17.
- Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, King MC. Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet*. 1994;8(4):399–404. doi: 10.1038/ng1294-399.
- Manguoglu AE, Lüleci G, Özçelik T, Colak T, Schayek H, Akaydin M, Friedman E. Germline mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes in Turkish breast/ovarian cancer patients. *Hum Mutat*. 2003;21(4):444–5. doi: 10.1002/humu.9119.
- Zhang Y, Long J, Lu W, Shu XO, Cai Q, Zheng Y, Li C, Li B, Gao YT, Zheng W. Rare coding variants and breast cancer risk: evaluation of susceptibility Loci identified in genome-wide association studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(4):622–8. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-1043.
- Vail PJ, Morris B, van Kan A, Burdett BC, Moyes K, Theisen A, Kerr ID, Wenstrup RJ, Eggington JM. Comparison of locus-specific databases for BRCA1 and BRCA2 variants reveals disparity in variant classification within and among databases. *J Community Genet*. 2015;6(4):351–9. doi: 10.1007/s12687-015-0220-x.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Specator E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5): 405–24. doi: 10.1038/gim.2015.30.
- Тищенко ПД, Шевченко СЮ. Казус Анджелены Джели и этические проблемы современной онкологии. *Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского*. 2015;(4):5–11.



References

1. World Health Organization. Cancer. Early diagnosis and screening. Breast cancer [Internet]. Available from: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>.
2. Malignant neoplasms in Russia in 2017 (incidence and mortality). Moscow: P.A. Herzen Moscow Research Oncological Institute; 2018. 250 p. Russian.
3. Holford TR, Cronin KA, Mariotto AB, Feuer EJ. Changing patterns in breast cancer incidence trends. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2006;(36): 19–25. doi: 10.1093/jncimonographs/lgj016.
4. Rasskazova EA, Rozhkov NI. Screening for early detection of breast cancer. *Research'n Practical Medicine Journal.* 2014;1(1):45–51. Russian. doi: 10.17709/2409-2231-2014-1-1-45-51.
5. Bytautas J, Dobrow M, Sullivan T, Brown A. Accountability in the ontario cancer services system: a qualitative study of system leaders' perspectives. *Health Policy.* 2014;10(Spec issue):45–55. doi: 10.12927/hcpol.2014.23919.
6. National Comprehensive Cancer Network. NCCN guidelines for detection, prevention, & risk reduction: genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian 2015 [Internet]. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx#detection.
7. Ossa CA, Torres D. Founder and recurrent mutations in BRCA1 and BRCA2 genes in Latin American countries: state of the art and literature review. *Oncologist.* 2016;21(7):832–9. doi: 10.1634/theoncologist.2015-0416.
8. Parkes A, Arun BK, Litton JK. Systemic treatment strategies for patients with hereditary breast cancer syndromes. *Oncologist.* 2017;22(6):655–66. doi: 10.1634/theoncologist.2016-0430.
9. Lynch HT, Snyder C, Lynch J. Hereditary breast cancer: practical pursuit for clinical translation. *Ann Surg Oncol.* 2012;19(6):1723–31. doi: 10.1245/s10434-012-2256-z.
10. Imyanitov EN. Hereditary breast cancer. *Practical Oncology.* 2010;11(4):258–66. Russian.
11. Paul A, Paul S. The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2014;19:605–18. doi: 10.2741/4230.
12. Brozek I, Cybulska C, Ratajska M, Piatkowska M, Kluska A, Balabas A, Dabrowska M, Nowakowska D, Niwinska A, Pamula-Pilat J, Tecza K, Pekala W, Rembowska J, Nowicka K, Mosor M, Januszkievicz-Lewandowska D, Rachtan J, Grzybowska E, Nowak J, Steffen J, Limon J. Prevalence of the most frequent BRCA1 mutations in Polish population. *J Appl Genet.* 2011;52(3):325–30. doi: 10.1007/s13353-011-0040-6.
13. Lyubchenko LN, Bateneva EI, Abramov IS, Emelyanova MA, Budik YA, Tyulyandina AS, Krokhnina OV, Vorotnikov IK, Sobolevskiy VA, Nasedkina TV, Portnoy SM. Hereditary breast and ovarian cancer. *Malignant Tumours.* 2013;(2): 53–61. Russian. doi: 10.18027/2224-5057-2013-2-53-61.
14. Shimelis H, LaDuca H, Hu C, Hart SN, Na J, Thomas A, Akinhanmi M, Moore RM, Brauch H, Cox A, Eccles DM, Ewart-Toland A, Fasching PA, Fostira F, Garber J, Godwin AK, Konstantopoulou I, Nevanlinna H, Sharma P, Yannoukakos D, Yao S, Feng BJ, Tiffin Davis B, Lilyquist J, Pesaran T, Goldgar DE, Polley EC, Dolinsky JS, Couch FJ. Triple-negative breast cancer risk genes identified by multigene hereditary cancer panel testing. *J Natl Cancer Inst.* 2018;110(8):855–62. doi: 10.1093/jnci/djy106.
15. van der Groep P, van der Wall E, van Diest PJ. Pathology of hereditary breast cancer. *Cell Oncol (Dordr).* 2011;34(2):71–88. doi: 10.1007/s13402-011-0010-3.
16. Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene.* 2006;25(43):5864–74. doi: 10.1038/sj.onc.1209874.
17. Yılmaz NK, Karagin PH, Terzi YK, Kahyaoglu İ, Yılmaz S, Erkaya S, Şahin Fİ. BRCA1 and BRCA2 sequence variations detected with next-generation sequencing in patients with premature ovarian insufficiency. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2016;17(2):77–82. doi: 10.5152/jtgga.2016.16035.
18. Winter C, Nilsson MP, Olsson E, George AM, Chen Y, Kvist A, Törngren T, Vallon-Christersson J, Hegardt C, Häkkinen J, Jönsson G, Grabau D, Malmberg M, Kristoffersson U, Rehn M, Grubberger-Saal SK, Larsson C, Borg Å, Loman N, Saal LH. Targeted sequencing of BRCA1 and BRCA2 across a large unselected breast cancer cohort suggests that one-third of mutations are somatic. *Ann Oncol.* 2016;27(8): 1532–8. doi: 10.1093/annonc/mdw209.
19. Balmaña J, Díez O, Rubio IT, Cardoso F; ESMO Guidelines Working Group. BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol.* 2011;22 Suppl 6:vi31–4. doi: 10.1093/annonc/mdr373.
20. Domchek SM, Friebel TM, Singer CF, Evans DG, Lynch HT, Isaacs C, Garber JE, Neuhausen SL, Matloff E, Eeles R, Pichert G, Van t'veer L, Tung N, Weitzel JN, Couch FJ, Rubinstein WS, Ganz PA, Daly MB, Olopade OI, Tomlinson G, Schildkraut J, Blum JL, Rebbeck TR. Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. *JAMA.* 2010;304(9):967–75. doi: 10.1001/jama.2010.1237.
21. Lubchenko LN. Genetic testing in hereditary breast cancer. *Practical Oncology.* 2014;15(3): 107–17. Russian.
22. Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, King MC. Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet.* 1994;8(4):399–404. doi: 10.1038/ng1294-399.
23. Manguoglu AE, Lülecı G, Özçelik T, Colak T, Schayek H, Akaydin M, Friedman E. Germline mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes in Turkish breast/ovarian cancer patients. *Hum Mutat.* 2003;21(4):444–5. doi: 10.1002/humu.9119.
24. Zhang Y, Long J, Lu W, Shu XO, Cai Q, Zheng Y, Li C, Li B, Gao YT, Zheng W. Rare coding variants and breast cancer risk: evaluation of susceptibility Loci identified in genome-wide association studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(4):622–8. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-1043.
25. Vail PJ, Morris B, van Kan A, Burdett BC, Moyes K, Theisen A, Kerr ID, Wenstrup RJ, Eggington JM. Comparison of locus-specific databases for BRCA1 and BRCA2 variants reveals disparity in variant classification within and among databases. *J Community Genet.* 2015;6(4):351–9. doi: 10.1007/s12687-015-0220-x.
26. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Specator E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5): 405–24. doi: 10.1038/gim.2015.30.
27. Tishchenko PD, Shevchenko SYu. Angelina Jolie's casus and ethical problems of modern oncology. *Clinical and Experimental Surgery. Petrovsky Journal.* 2015;(4):5–11. Russian.



Algorithm of molecular genetic investigation to identify hereditary *BRCA*-associated breast cancer

G.P. Snigireva¹ • V.A. Romyantseva² • E.I. Novikova¹ •
N.N. Novitskaya¹ • E.N. Telysheva¹ • E.D. Khazins¹ • E.G. Shaikhaev¹

Background: About 30% of cases of hereditary breast cancer (BC) are associated with the *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations. The absence of the programs of mandatory genetic screening for hereditary *BRCA*-associated BC in Russia, as well as of an algorithm for molecular genetic testing does not allow fully accomplishing the necessary preventive, diagnostic and medical measures. **Aim:** To elaborate an algorithm for molecular genetic testing of BC patients in order to improve the efficacy of identification of the hereditary nature of the disease. **Materials and methods:** The study is based on the analysis of the results of molecular genetic testing of 3826 BC patients aged from 22 to 90 years, who were examined and treated in the Russian Research Center of Roentgenoradiology (Moscow) from 2010 to 2016. At the first stage of the study, germinal mutation in the *BRCA1* and *BRCA2* genes prevalent in the Russian population were identified by the real-time polymerase chain reaction (PCR). At the second stage, we searched for rare genetic variants of these genes by the 'next generation sequencing' (NGS) method.

Results: The real-time PCR (the first stage) showed that the prevalence of the most typical for the Russian population mutations in the *BRCA1* gene, associated with BC risk, was 3.5% (132/3826 BC patients). No carriers of the *BRCA2* mutations were identified. Based on the analysis of a questionnaire survey and primary medical documentation, a group of 717 patients was selected from the total cohort, who had clinical features of the hereditary disease (CFHD). In this group, the *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations were found in 126 patients (17.6%). At the second stage, a group of 193 patients with CFHD and no *BRCA1* and *BRCA2* mutations prevalent in the Russian population was investigated by

NGS. Rare pathogenic mutations of these genes were found in 27 patients (14%). In total, it may be concluded that at least 30% of the BC patients with CFHD have germinal mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes. Based on the data obtained, we have developed the algorithm of molecular genetic testing of BC patients aimed at identification of the hereditary nature of the disease. **Conclusion:** The high frequency of mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes found in this study in BC patients with CFHD confirms the necessity of genetic testing for this hereditary disease. The information on its hereditary nature allows for the introduction of essential therapy modification with a personalized approach. Regular follow-up of patients with hereditary BC and prevention of new BC cases and other cancers (ovarian, gastric, pancreatic and prostate cancer, as well as melanoma) in their relatives with *BRCA1* and *BRCA2* mutations have to be implemented by a multidisciplinary team (specialists in mammology, gynecology, oncology, medical genetics, chemotherapy and psychotherapy).

Key words: hereditary breast cancer, *BRCA1/2* genes, next generation sequencing (NGS), genetic consultation

For citation: Snigireva GP, Romyantseva VA, Novikova EI, Novitskaya NN, Telysheva EN, Khazins ED, Shaikhaev EG. Algorithm of molecular genetic investigation to identify hereditary *BRCA*-associated breast cancer. Almanac of Clinical Medicine. 2019;47(1):54–65. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-002.

Received 13 September 2018; accepted 16 January 2019. Published 06 February 2019

Galina P. Snigireva – PhD, Doctor of Biol. Sci., Head of Molecular Biology and Cytogenetics Laboratory¹
✉ 86 Profsoyuznaya ul., Moscow, 117997, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 334 92 88.
E-mail: sni_gal@mail.ru

Viktoriya A. Romyantseva – MD, PhD, Physician-Geneticist, Medical Genetics Laboratory²

Ekaterina I. Novikova – Junior Research Fellow, Molecular Biology and Cytogenetics Laboratory¹

Nataliya N. Novitskaya – Engineer, Molecular Biology and Cytogenetics Laboratory¹

Ekaterina N. Telysheva – Junior Research Fellow, Molecular Biology and Cytogenetics Laboratory¹

Eva D. Khazins – Engineer, Molecular Biology and Cytogenetics Laboratory¹

Evgeny G. Shaikhaev – Senior Research Fellow, Molecular Biology and Cytogenetics Laboratory¹

Funding

The study was performed as a part of the Government Contract No 115040640033 by the Ministry of Health of the Russian Federation.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

¹Russian Research Center of Roentgenoradiology; 86 Profsoyuznaya ul., Moscow, 117997, Russian Federation

²Petrovsky National Research Center of Surgery; 2 Abrikosovskiy pereulok, Moscow, 119991, Russian Federation