

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»

Ордена Трудового Красного Знамени

Медицинский институт имени С.И. Георгиевского

Салиева Гюзель Мустафаевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕНОСТИ РАКА ЯИЧНИКОВ
У КРЫМСКИХ ПАЦИЕНТОВ**

Научно-квалификационная работа

Аспирант 3-го года обучения кафедры общей и клинической
патофизиологии

Направления подготовки 30.06.01 «Фундаментальная медицина»

Научная специальность 3.3.3 «Патологическая физиология»

Научный руководитель:

профессор кафедры
общей и клинической патофизиологии
доктор медицинских наук, профессор
Фомочкина И.И.

г. Симферополь

2024 г.

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Молекулярно-генетические изменения в патогенезе рака яичников	10
1.2. Физиологическое значение репаративных систем клетки и их роль в этиопатогенезе рака яичников.	13
1.3. Структура и функция гена <i>BRCA1</i>	15
1.4. Структура и функция гена <i>BRCA2</i>	18
1.5. Структура и функция гена <i>PALB2</i>	20
1.3. Структура и функция гена <i>CHEK2</i>	23
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.	26
2.1. Отбор лиц и формирование исследуемых групп	26
2.2. Клинико-морфологическая характеристика исследуемых групп	27
2.3. Молекулярно-генетическое исследование.	29
2.4. Анализ и обработка полученных данных.	32
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	33
3.1. Частота и спектр выявленных герминальных мутаций в генах <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>CHEK2</i> , <i>PALB2</i> у больных РЯ и здоровых женщин.....	33
3.2. Клинические и патоморфологические характеристики НРЯ у женщин Республики Крым..	34
3.3. Клинические и патоморфологические характеристики НРЯ у носительниц мутаций в разных генах.....	44
3.4. Популяционная характеристика полученных результатов	43
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	45
ВЫВОДЫ	47
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	48
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	49

Введение

Несмотря на наличие большого перечня переменных факторов риска развития онкологических заболеваний, современная концепция канцерогенеза отводит ведущую роль в запуске опухолевого роста накоплению эффектов дисбаланса в системе генов контроля клеточного цикла, которые условно разделяются на онкогены и онкосупрессоры. Активирующие мутации в генах с канцерогенным потенциалом и инактивирующие мутации в генах, подавляющих малигнизацию и опухолевый рост – ключевой пусковой механизм многоступенчатого процесса опухолевой трансформации клеток [6, 16].

На сегодняшний день молекулярно-генетическое профилирование опухолей активно включается в процесс диагностики и лечения онкологических пациентов. Для многих типов рака определен спектр генов, изменение экспрессионной активности которых запускает и/или осложняет течение опухолевого процесса. В ряде случаев идентификация молекулярных механизмов патогенеза позволяет выбрать наиболее эффективную тактику лечения заболевания, включая оптимальный химиотерапевтический режим и/или таргетную терапию.

Широкое внедрение генетических методов диагностики в практическое здравоохранение значительно улучшило показатели эффективности диагностики и лечения злокачественных новообразований (ЗНО), однако на данный момент сохраняются существенные трудности при их использовании. Так, наиболее распространенным методом является проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) на образцах нуклеиновых кислот, выделенных из опухолевой ткани или лейкоцитов пациентов, с использованием стандартных панелей, включающих наиболее распространенные в популяции мутации. Безусловно, ПЦР-диагностика имеет ряд преимуществ: техническая простота, высокая скорость получения результатов и относительная дешевизна. Однако

ПЦР является упрощенным методом, минимально учитывающим молекулярно-генетическую гетерогенность опухолей лишь в объеме исследуемых мутаций.

Кроме того, используемые панели, как правило, являются стандартизированными и внедренными на уровне стандартов оказания медицинской помощи и утвержденных клинических рекомендаций по диагностике и лечению тех или иных ЗНО, однако во многих случаях генетические механизмы заболеваний вариабельны и зависят от разных факторов, в том числе, от географической и этнической принадлежности. Именно по этой причине в последние годы все более актуальными становятся популяционные исследования молекулярно-генетических основ патогенеза онкологических заболеваний. В частности, Российская Федерация является многонациональным и территориально большим государством, поэтому проведение подобных исследований в отдельно взятых регионах позволит значительно усовершенствовать молекулярно-генетическую диагностику ЗНО.

В данном контексте особое внимание обращают на себя опухоли женской репродуктивной системы, которые характеризуются высокой частотой встречаемости и выраженной генетической и морфологической гетерогенностью.

Так, из года в год, глобальная заболеваемость раком яичников (РЯ) прогрессивно растет. Более того, опухоли яичников лидируют в структуре смертности от онкогинекологической патологии. По данным, представленным GLOBOCAN в 2021 году, в 2020 году диагноз РЯ был установлен более чем 300 тысяч раз (1,6 % и 3,4 % всех случаев ЗНО и среди женщин соответственно). В том же 2020 году зарегистрировано более 200 тысяч случаев смерти пациенток с диагнозом РЯ (2,1 % и 4,7 % в структуре общей смертности от ЗНО и среди женщин соответственно) [52]. В Российской Федерации сохраняются такие же тенденции.

Таким образом, более половины случаев РЯ завершаются летальным исходом, что позволяет сделать вывод об агрессивности и тяжелом течении данной патологии. Это объясняется рядом факторов: установление диагноза

преимущественно на поздних стадиях, отсутствие патогномичной симптоматики, раннее и быстрое формирование имплантов, резистентность ко многим режимам лекарственной противоопухолевой терапии, а также высокая частота рецидивирования.

Ведущую роль в патогенезе как наследственных, так и спорадических форм РЯ играют структурно-функциональные изменения в генах-супрессорах опухолевого роста. Известно, что до 85 % случаев наследственного рака яичников (НРЯ) ассоциированы герминогенными мутациями в генах группы *BRCA*, для которых характерно аутосомно-доминантное наследование и высокая степень пенетрантности [14]. Носительство здоровыми женщинами мутаций в этих генах повышает общий суммарный риск развития РЯ до 54 %, а наличие семейного анамнеза по ЗНО у ближайших родственников (I-II линии) увеличивает риск развития РЯ более чем в 3 раза [8].

Проявлением генетической гетерогенности НРЯ является выраженная вариабельность распространённости мутаций, многие из которых характеризуются популяционной и этнической специфичностью. Более того, в наиболее генетически однородных и закрытых этнических группах спектр значимых мутаций может быть значительно сужен, что существенно упрощает молекулярно-генетическую диагностику заболеваний. Ярким примером этого явления считают абсолютное преобладание (до 98% случаев) *BRCA1*-мутаций 188del11, 185delAG, 5382insC среди евреев европейского происхождения [32].

По данным ряда исследований, до 70-90% всех выявленных мутаций на территории России приходятся на следующие мутации в гене *BRCA1*: 5382InsC (5266dupC), 4153DelA(4035delA), 185delAG(68_69del), 2080delA (1961del), 3819delGTAAA(3700_3104del), 3875delGTCT (3755_3758del), 300 T> G (181 T>G, Cys61Gly), и мутацию 6174DelT в гене *BRCA2*, при этом отмечается явное превалирование мутации *BRCA1* 5382InsC, которая считается «фаундер»-мутацией для населения России [9].

Хотя в большинстве случаев этот спектр является актуальным для славянского населения разных регионов Российской Федерации, все больше

исследований демонстрируют важность определения региональных молекулярно-генетических особенностей заболеваний [3, 4, 11].

Так, среди коренного населения Дальнего Востока (бурятки, тувинки, алтайки) не были обнаружены мутации *BRCA1* и *BRCA2*, а в Республике Башкортостан «фаундер»-мутация *BRCA1* с.5266dupC встречалась с частотой менее 4% [11, 14 БСМ]. В выборке татар около 1,3% случаев НРМЖ, НРЯ, ЗНО предстательной железы ассоциированы с мутацией *BRCA1* с.5161C>T, которая не входит в перечень 8 самых распространенных [1].

Более того, несмотря на доказанный существенный вклад генов *BRCA1* и *BRCA2* в патогенез РЯ, ошибкой было бы исключение потенциального вклада других генов в развитии заболевания. В настоящий момент активно изучается значение и частота встречаемости структурно-функциональных нарушений в целом ряде генов, таких как *BARD1*, *TP53*, *PALB2*, *PTEN*, *MHS*, *CHEK2*, *NBS1*, *RAD51* и др. [56].

Все больше внимания получают молекулярно-генетические изменения гена *CHEK2*. Полиморфизмы в этом гене выявляются в ходе различных исследований все чаще, однако до сегодняшнего дня не существует единой точки зрения на ее роль в повышении риска развития РЯ/РМЖ [43].

В настоящее время молекулярно-генетические особенности НРЯ у крымских пациентов изучены недостаточно, хотя крымский регион населен различными этническими группами, которые характеризуются уникальным этногенезом. В частности, крымские татары – немногочисленная и относительно генетически изолированная группа, которая представляет особый интерес в контексте молекулярно-генетических исследований. Понимание молекулярно-генетических особенностей НРЯ позволит значительно улучшить качество оказания помощи пациенткам с РЯ в Крыму.

Цель исследования: изучить качественный и частотный спектр мутаций в генах предрасположенности к наследственному раку яичников (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *CHEK2*) у пациенток Республики Крым для улучшения молекулярно-генетической диагностики рака яичников в Крыму.

Задачи исследования:

1. Определить качественный и частотный диапазон мутаций в генах наследственной предрасположенности *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* и *PALB2* у пациенток с диагнозом РЯ.
2. Сравнить клинические и патоморфологические особенности наследственного рака яичников у пациентов с мутациями и без них.
3. Сравнить особенности молекулярно-генетической природы НРЯ у больных, принадлежащих к различным этническим группам.
4. Изучить качественный и частотный диапазон мутаций в исследуемых генах среди здоровых носительниц.
5. Сравнить полученные результаты с тенденциями, характерными для населения Российской Федерации в целом.
6. На основании полученных результатов сформировать рекомендации по включению выявленных мутаций в молекулярно-генетическую диагностику пациенток с РЯ.

Научная новизна

В работе впервые охарактеризованы этнические, возрастные и эпидемиологические особенности наследственного рака яичника в женской части населения Республики Крым и проведено сравнение полученных данных с общероссийскими и общемировыми показателями.

Исследованы и охарактеризованы генетические механизмы канцерогенеза РЯ у пациенток крымского региона и их роль в этиопатогенезе наследственного рака яичников в славянской и крымскотатарской популяционных группах, в том числе выполнена детекция наиболее распространенных генетических мутаций генов *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* и *PALB2*.

Описаны ранее неизученные генетические характеристики наследственного рака яичника у крымских татарок.

Теоретическое и практическое значение полученных результатов

Изучение и формирование представлений о молекулярно-генетических и клинико-морфологических особенностях наследственных форм злокачественных новообразований позволяет оптимизировать диагностические и лечебные алгоритмы данных патологий.

Определение спектра доминирующих среди женщин Крыма мутаций, ассоциированных с развитием рака яичников, позволяет усовершенствовать диагностический поиск, повысить частоту выявления заболевания на ранних стадиях и/или устанавливать факт высокого риска еще до дебюта заболевания.

Подтверждение молекулярного механизма опухолевого роста также позволяет выбрать наиболее эффективные схемы лечения, в том числе, таргетного, а соответственно улучшить качество и продолжительность жизни данной категории пациентов.

Апробация результатов

Результаты проводимого исследования были представлены на следующих конференциях:

1. Научно-практическая конференция «Медицинская наука Крыма: от истоков к современности», г. Симферополь, 2022 г.

Доклад: «Молекулярно-генетические особенности рака яичников у населения Республики Крым»

2. 95-я Всероссийская научно-практическая конференция, посвященная десятилетию науки и технологий в России «Теоретические и практические аспекты современной медицины», г. Симферополь, 2023г.

Доклад: «Сравнительная характеристика молекулярно-генетических особенностей наследственного рака молочной железы и рака яичников у пациентов Республики Крым»

3. XXVI Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и здоровье», г. Санкт-Петербург, 2023г.

Доклад: «Молекулярно-генетическая и клиничко-морфологическая характеристика наследственного рака яичников в Республике Крым»

4. 9th International congress of pathophysiology and 5th congress of physiological sciences of Serbia with international participation, Belgrade, Serbia, 2023.

Доклад: «Hereditary ovarian cancer genetics in Crimean patients»

5. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Фундаментальные исследования в онкологии 2023», ФГБУ «НМИЦ Онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, 2023

Доклад: «Молекулярно-генетические и клиничко-морфологические особенности рака яичников у пациентов Республики Крым»

6. VIII Всероссийская конференция по молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ Онкологии им. Н.Н. Блохина», г. Москва, 2023г.

Доклад: «Герминальные мутации в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2* у населения Республики Крым»

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. Молекулярно-генетические изменения в патогенезе рака яичников

Канцерогенез — сложный процесс, характеризующийся накоплением комплекса генетических и эпигенетических изменений, результатом которого является формирование дефектов системы контроля и поддержания целостности и стабильности генома, а также нарушение регуляции клеточного цикла, активации апоптоза, дифференцировки и модификация морфогенетических характеристик клетки. Эти изменения обуславливают трансформацию нормальной клетки в опухолевую, которая характеризуется рядом свойств: генетическая нестабильность, иммортализация, неконтролируемая пролиферация, повышение миграционного потенциала и жизнеспособности при неблагоприятных экзо- и эндогенных воздействиях [8].

Ключевую роль в формировании современного представления о канцерогенезе, в том числе наследственных вариантов, сыграло исследование А. Knudson, результаты которого были опубликованы в 1971 году. Knudson изучил роль инактивации гена RB1 в развитии ретинобластомы. В последствие он представил «двухударную» теорию: малигнизация нормальной клетки происходит в результате двух последовательных мутационных процессов («удара»). Результатом первой мутации является формирование клетки с повышенным риском последующей злокачественной трансформации, однако непосредственно малигнизации наступает после второй мутации.

Такие изменения могут произойти как в клетках зародышевого ряда, так и в соматических клетках, что объясняет происхождение случаев наследственного и спорадического рака одной и той же локализации. При этом в случае возникновения наследственной формы заболевания генетическое повреждение с большой вероятностью будет унаследовано. Позднее ген RB1 был идентифицирован как первый ген-супрессор опухолевого роста. [34]

Риск развития РЯ обусловлен большим количеством факторов риска, как модифицируемых, так и немодифицируемых (таблица 1). Безусловно, наследственная предрасположенность играет важнейшую роль в патогенезе РЯ, однако факторы также способны воздействовать на генетические основы онкогенеза. В частности, они могут оказывать непосредственно воздействие на геном клеток, приводя к возникновению мутаций, изменять эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов или способствовать пенетрации герминальных или соматических мутаций [5].

Таблица 1 – Факторы риска развития РЯ

Модифицируемые	Немодифицируемые
Поздняя мезопауза	Наследственная предрасположенность
Заместительная гормональная терапия в постменопаузальном периоде	Раннее менархе
Нереализованная репродуктивная функция	Бесплодие, не поддающееся терапии
Синдром поликистозных яичников	
Курение	
Избыточная масса тела	

Известно, что в 17 % случаев приходится на НРЯ [32]. В свою очередь, до 90 % случаев НРЯ ассоциированы с мутациями в гене *BRCA1*. Тем не менее, результаты многолетнего исследования случаев *BRCA*-негативного НРЯ и НРМЖ продемонстрировали наличие спектра генов, патология которых также вносит вклад в патогенез этих заболеваний. В последние годы все больше

внимания привлекают мутации разной степени пенетрантности в генах, *CHEK2*, *BARD1*, *PALB2*, *NBS1*, *PTEN*, *ATM*, *TP53* и др. [56].

Стремительное накопление подтверждающих данных о роли различных генов в этиопатогенезе НРЯ привело к необходимости формирования современной классификации неоплазий яичников, в основе которой лежат патоморфологические генетические параметры опухолей [13].

Так, в запуске опухолевого роста в первом случае ведущую роль играют преимущественно редкие мутации генов *PTEN*, *KRAS*, *BRAF*. Такие неоплазии достаточно генетически стабильны, а скорость их пролиферации относительно невысокая. В их прогрессии четко прослеживается последовательность опухолевой трансформацией, которая характеризуется стадийностью: доброкачественная → пограничная → злокачественная опухоль. Патоморфологически к этой группе можно отнести эндометриоидные и серозные опухоли низкой степени злокачественности. [27].

Опухоли II типа характеризуются более высокой частотой встречаемости и наиболее часто развиваются в результате инактивирующих мутаций генов-супрессоров опухолевого роста *BRCA1*, *BRCA2* и *TP53*. Эти новообразования характеризуются выраженными нарушениями стабильности и целостности генома, агрессивный, быстрый рост, высокой скоростью формирования метастатических очагов. При патоморфологическом исследовании наиболее часто выявляются низкодифференцированные серозные и эндометриоидные опухоли [13].

Также сегодня невозможно игнорировать нарушения эпигенетической регуляции экспрессии генов, в результате которых происходит подавление транскрипции генов-супрессоров опухолевого роста и/или активация проонкогенов, как еще один молекулярно-генетический фактор канцерогенеза. Важно отметить, что при изменении на эпигенетическом уровне первичная нуклеотидная последовательность генах не изменяется, поэтому выявить предрасполагающие мутации не представляется возможным. Оценка статуса

метиляции генома на сегодняшний день далека от внедрения в рутинную практику и требует дополнительного изучения и совершенствования [43].

1.2. Физиологическое значение репаративных систем клетки и их роль в этиопатогенезе рака яичников

Генетический аппарат клетки постоянно находится в состоянии активного функционирования, что неизбежно приводит к возникновению ошибок. Повреждения генома могут возникать спонтанно в любой момент клеточного цикла или индуцируются в результате воздействия различных факторов. Так, ультрафиолетовое и ионизирующее излучение, а также химические агенты являются известными экзогенными факторами, повреждающими генетический аппарат.

В свою очередь, спонтанные нарушения невозможно предсказать или предупредить, так как они происходят постоянно в процессе синтеза нуклеиновых кислот. Например, сшивание ошибочных азотистых оснований, разрывы цепей ДНК и др. В результате накопления таких ошибок геном утрачивает свою целостность и стабильность, происходит нарушение функции клетки и в конечном итоге ее злокачественная трансформация. Для предупреждения такого исхода в клетке функционирует целый ряд репаративных систем [19].

Исправное функционирование систем репарации клетки является важнейшим фактором предупреждения запуска опухолевой трансформации. При возникновении повреждения ДНК в работу включается одна из нескольких доступных систем (таблица 2). В большинстве случаев, восстановление структуры и функции генома – процесс энерго- и ресурсоемкий, требующий активации каскада ферментативных реакций [25].

Самым опасным и мутагенным повреждением ДНК являются одновременные разрывы обеих цепей. В случае обнаружения такого повреждения клеточный цикл подлежит немедленной остановке в настоящей

фазе до момента восстановления поврежденных цепей. В данном случае в работу могут включиться две системы: система негомологичной (Non-homologous end joining) и гомологичной рекомбинация (Homologous recombination). NHEJ — упрощенный механизм, который восстанавливает ДНК через прямое связывание цепей без предварительной ферментативной обработки места разрыва, в результате чего неизбежно происходит потеря определённой части генетической информации.

Таблица 2 – Пути репарации повреждений ДНК [25]

Повреждение		Репарация
Нуклеотидное	Моно-	Экцизионная репарация оснований
		Поли-(АДФ-рибоза)-полимеразный механизм
	Поли-	Экцизионная репарация нуклеотидов
Ошибки репликации		Механизм коррекции неспаренных нуклеотидов
Разрывы цепей		Гомологичная рекомбинация
		Негомологичная рекомбинации
		Одноцепочечный отжиг

При активации системы гомологичной репарации поврежденные участки восстанавливаются в результате реакции матричного синтеза с помощью гомологичной сестринской хроматиды. В таком случае генетический материал восстанавливается в полной мере. Гомологичная рекомбинация является наиболее предпочтительным методом репарации, однако она доступна только

при наличии удвоенного набора хромосом (синтетическая и постсинтетическая фазы клеточного цикла), в то время как негомологичная рекомбинация может быть осуществлена в любой момент жизни клетки [36].

В случае возникновения ДЦР в S и/или G2 фазах информации о повреждающем событии распознается одновременно двумя сигнальными системами: Ku70/Ku80, запускающая систему негомологичной рекомбинации, и MRN, которая запускает HR. Далее происходит конкурентное ингибирование системы негомологичной рекомбинации с целью сохранения преимущества более точного и менее мутагенного механизма репарации ДЦР, которая представляет собой сложный каскад реакций, реализующихся благодаря большому количеству протеинов, включая продукты экспрессии генов *BRCA 1,2*, *PALB 2*, *BARD*, *p53*, *ATM*, *CHEK 2*, и др. [24].

1.3. Строение и функция гена *BRCA1*

Ген *BRCA1* — известный ген-онкосупрессор, включающий 24 экзона, 22 из которых являются кодирующими и 2 некодирующими. Продуктом экспрессии этого гена является ядерный фосфопротеин, состоящий из 1863 аминокислот, основной функцией которого является поддержание стабильности генома и репарация двухцепочечных разрывов ДНК. [42,45]

Взаимодействуя с детектирующими повреждения ДНК агентами и передатчиками сигнала повреждения, а также с другими генами-супрессорами (например, *BARD1*, *CeIP*, *NBS1*, *RAD50*, *RAD51* и др.), ген *BRCA1* формирует BRCA-ассоциированный комплекс презервации целостности ДНК (BASC), который принимает участие в процессе гомологичной рекомбинации при ДЦР.

Эти взаимодействия прежде всего обеспечиваются структурой данного белка и наличием ряда функциональных зон: N-концевой Really Interesting New Gene (RING) домен, nuclear export (NES) и nuclear localization signals (NLS) участки, coiled-coil-домен, serine cluster domain (SCD), и breast cancer C-terminal (BRCT) домен. (рисунок 1) [26].

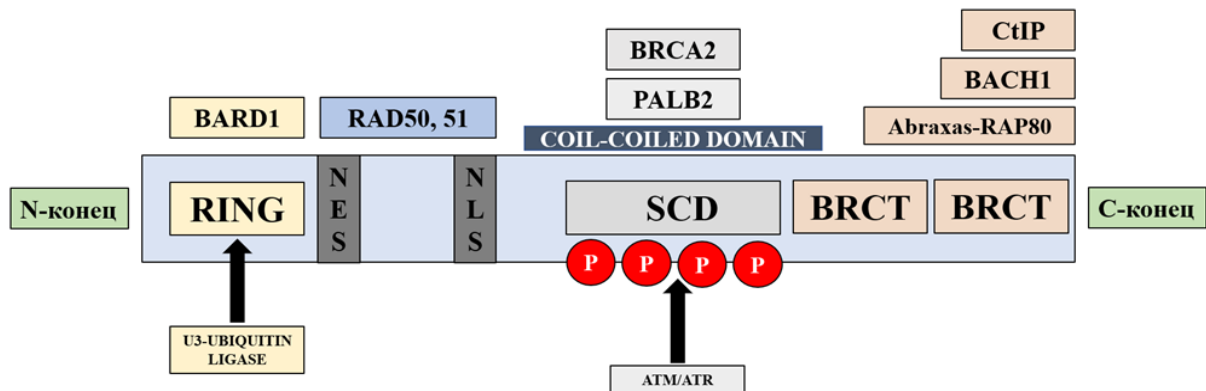


Рисунок 1 – Схема строения молекулы BRCA1 с указанием основных функциональных зон

Ряд исследований продемонстрировали, что важное значение в регулировании выбора между путями рекомбинации имеет продукт экспрессии гена *BRCA1*, который играет в пользу гомологичной рекомбинации. Ингибируя p53-связывающий белок 1, BRCA1 предотвращает aberrантное концевое соединение и переключает репарацию на HR механизм. [24]

С помощью BRCT-домена белок образует с другими протеинами многочисленные функционально активные комплексы, которые участвуют в процессе гомологичной рекомбинации. Наиболее полно изучено значение трех комплексов, которые образуются при взаимодействии с белками Abraxas-RAP80, BACH1 и CtIP. Эти комплексы играют важнейшую роль в обеспечении адекватной гомологичной рекомбинации ДЦР, а нарушение их образования приводит к сбоям гомологичной рекомбинации и нестабильности генома (Таблица 3) [26, 29].

Еще один BRCA1-содержащий комплекс, формирующийся посредством coiled-coil домена BRCA1, включает BRCA1, PALB2 и BRCA2 и специфически участвует в репарации ДЦР путем гомологичной рекомбинации [60, 62].

Функция RING-домена протеина BRCA1 — взаимодействие с RING-доменом белка BARD1. Образованный в результате комплекс BRCA1-BARD1

играет ключевую роль в двух процессах: стабилизация белка BRCA1 и присоединение убиквитин-конъюгирующего фермента. При нарушении формирования гетеродимера BRCA1 оказывается нестабильным, что ведет к его быстрому разрушению.

Таблица 3 – Функции комплексов BRCA1 A, B, C

Комплекс	Белки	Функции
BRCA1 A	AbraXas-RAP80	Супрессия избыточной гомологичной рекомбинации путем ограничения чрезмерного поступления BRCA1 и ряда других белков-супрессоров в очаг повреждения
BRCA1 B	BACH1	Препятствие преждевременной элиминации протеина RAD51, который обеспечивает контакт поврежденной цепочки ДНК с сестринской хроматидой, из очага повреждения, остановка клеточного цикла в G1/S, формирование «фокуса повреждения»
BRCA1 C	CtIP	Увеличение концентрации протеина A (RPA), который поддерживает одноцепочечную ДНК в развернутом и неспаренном виде, в очаге повреждения, остановка клеточного цикла в G2/M. В дальнейшем RPA заменяется на RAD51.

Присоединение убиквитин-конъюгирующего фермента необходимо для того, чтобы комплекс BRCA1-BARD1 был способен выполнить функцию убиквитинлигазы, которая принимает участие в убиквитинзависимом протеинолизе. Субстратом для реализации этой функции белка являются гистоны, тубулин и другие. [26, 57].

В частности, благодаря этой способности BRCA1, помимо всего прочего, регулирует функционирование центромеры. На ранних этапах комплекс BRCA1-BARD1 инициирует процесс сборки, в то время как на поздних – подавляет патологическое увеличение их количества, препятствуя, таким образом, развитию аномального веретена деления и анеуплоидии [23, 28, 55].

Таким образом, ген *BRCA1* участвует в важнейших процессах жизнедеятельности клетки, таких как регуляция клеточного цикла, восстановление повреждений ДНК путем гомологичной рекомбинации, формирование правильного веретена деления.

BRCA-дефицитные клетки характеризуются накоплением ошибок репараций, нестабильностью генома, нарушением процессов регуляции клеточного цикла.

1.3. Строение и функция гена *BRCA2*

Ген-супрессор опухолевого роста *BRCA2* содержит 27 экзонов, 26 из которых являются кодирующими. Продукт экспрессии *BRCA2* — протеин, состоящий из 3418 аминокислот и участвующий в процессах гомологичной рекомбинации [46].

В отличие от многофункционального значения *BRCA1*, главная и практически единственная роль *BRCA2* заключается в обеспечении включения в процесс гомологичной рекомбинации белка RAD51, который является связующим звеном между поврежденной цепью и гомологичной хромосомой. Еще одно важное отличие от *BRCA1* заключается в том, что протеин *BRCA2*

функционирует только в ядре, что обеспечивается наличием NLS (nuclear localization signal) участков.

В структуре гена BRCA2 выделяют несколько функциональных доменов (Рисунок 2).

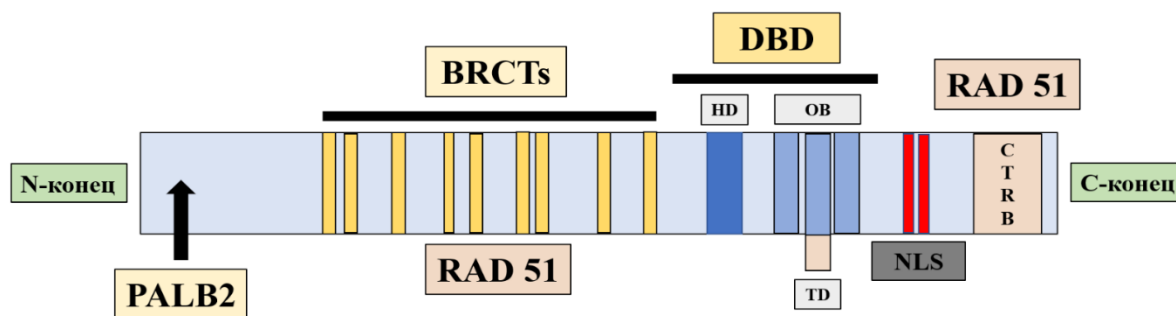


Рисунок 2 – Схема строения молекулы BRCA2 с указанием основных функциональных зон.

В N-терминальной части молекулы находится домен, связывающий белок PALB2 по аминокислотам 21–39. Основное значение PALB2 заключается в содействии BRCA2 и обеспечении взаимодействия между BRCA1-BRCA2, индукции поступления BRCA2 к месту повреждения и связывания его с RAD51 [46, 53].

В центральной части BRCA2 содержит восемь BRC-повторов (консервативный повторяющийся мотив из 38 аминокислот) между аминокислотными остатками 1009 и 2083. Этот участок отвечает за взаимодействие с рекомбиназами RAD51 и Dmc1 (DNA meiotic recombinase 1) [40]. На начальных этапах HR после формирования «фокуса повреждения» с помощью BRCA1 происходит нуклеолиз одной из цепей ДНК с образованием одноцепочечного нуклеофиламента, защищенного протеином RPA. По мере прогрессирования процесса репарации этот белок специфично заменяется на RAD51 с помощью BRCA2 и белков-партнеров (PALB2, Dmc1). В свою очередь, рекомбиназа RAD51 в процессе HR необходима для поиска и

обеспечения корректного взаимодействия нуклеофиламенты с гомологичной хромосомой [50].

Далее описан ДНК-связывающий домен BRCA2 (DBD – DNA binding domain), включающий 5 компонентов: α -спиральный домен (H) из 190 аминокислот, три складки связывания олигонуклеотидов (OB), которые представляют собой модули связывания одноцепочечной ДНК, и башенный домен (TD), который выступает из OB2 и связывает двухцепочечную ДНК. [59]

С-терминальная часть молекулы BRCA2 содержит два сайта фосфорилирования NLS (nuclear localization signal) и циклин-зависимой киназы (CDK) и С-концевой домен (CTRB), который является еще одной дополнительной областью взаимодействия с протеином RAD51 [30].

Таким образом, процессе HR BRCA2 играет роль трансферазы, которая специфично переносит белок RAD51 на однонитчатую ДНК, защищая ее от нуклеолиза. Несмотря на то, что взаимодействие рекомбиназы RAD51 с однонитчатой ДНК может происходить и без непосредственного участия BRCA2, в этом случае эффективность и точность процесса гомологичной рекомбинации критически снижается.

1.4. Строение и функция гена *PALB2*

Ген *PALB2* (Partner and localizer of BRCA2) кодирует белок, состоящий из 1186 аминокислот. Впервые белок PALB2 был идентифицирован в 2006 году методом масс-спектрометрии как важный белок, взаимодействующий с BRCA2. В том же исследовании был идентифицирован и описан ген PALB2. [58]

Продукт экспрессии гена PALB2 функционирует в хроматине и в нуклеоплазме в интерфазу. Взаимодействуя с большим количеством других белков, такими как BRCA1, BRCA2, RAD51, RAD51C и XRCC3, PALB2 принимает участие в процессе HR. При этом PALB2 играет ключевую роль в координации их функционирования. [47]. В частности, прямое связывание с BRCA1 опосредует мобилизацию PALB2 в очаге повреждения, а KEAP1-

зависимое убиквитинирование coiled-coil домена PALB2 подавляет HR в G1фазе клеточного цикла путем ингибирования взаимодействия PALB2 с BRCA1 [49, 61].

Реализация функций продукта экспрессии *PALB2* и его взаимодействие с другими протеинами обусловлено структурными особенностями молекулы, которые характеризуются наличием большого количества функциональных доменов (рисунок 3).

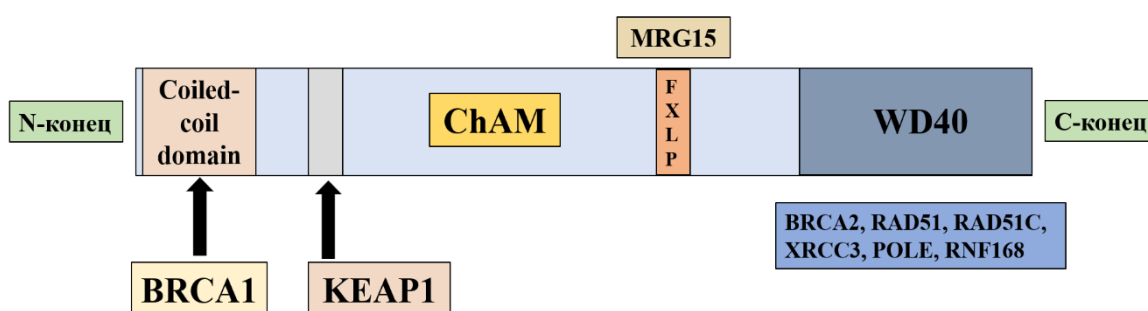


Рисунок 3 – Схема строения молекулы PALB2 с указанием основных функциональных зон.

В N-терминальной части PALB2 содержит coiled-coil домен (аминокислоты 9-44), который опосредует взаимодействие с BRCA1. Связывание BRCA1 и PALB2 главным образом необходимо для формирования комплекса BRCA (BRCA1-PALB2-BRCA2-RAD51). Однако также отмечается роль комплекса BRCA1-PALB2 в направлении процесса репарации ДЦР по пути гомологичной рекомбинации и блокировании репарации методом одноцепочечного отжига, который является относительно мутагенным. Anantha и коллеги в своих исследованиях продемонстрировали, что истощение количества белка PALB2 в клетке приводит к значительному активации системы одноцепочечного отжига, в то время как угнетение как гомологичной

рекомбинации, так и процессов отжига является результатом снижения экспрессии *BRCA1* [17].

Соседняя высококонсервативная последовательность из 7 аминокислот (88-94) LDEETGE отвечает за взаимодействие с медиатором окислительного стресса KEAP1. Данное взаимодействие способствует реализации антиоксидантной активности PALB2, которая обеспечивается конкурентным связыванием KEAP1. Это подтверждается повышенным количеством свободных радикалов и снижением экспрессии генов, регулируемых NRF2, в клетках со сниженной экспрессией PALB2 [39].

В центральной части молекулы PALB2 содержится хроматин-связывающий мотив (ChAM) (395–446) и мотив FXLP (612-615), который связывается с MRG15, тем самым способствуя взаимодействию PALB2 с хроматином [21, 31]. Основная функция MRG15 заключается в регулировании транскрипции через ремоделирование хроматина путем ацетилирования гистонов. [20, 21, 22, 31, 30, 54].

В 2017 году Bleuyard et al. выдвинули гипотезу, согласно которой комплекс MRG15-PALB2 внутри неповрежденного хроматина поддерживает стабильность хроматина во время репликации ДНК. Эта идея позднее была подтверждена проведением реакции иммунопреципитации-секвенирования хроматина PALB2 по всему геному. Кроме того, образование белка PALB2, утратившего способность связывания с MRG15, привело к нарушению пролиферации, стрессу ДНК и нестабильности генома [21].

Таким образом, PALB2 включается в работу сразу после повреждения ДНК и отвечает за формирование немедленного ответа на ошибки репликации, тем самым поддерживая стабильность генома. Кроме того, PALB2 обладает способностью связывания хроматина, что облегчает восстановление остановившихся репликационных вилок. [44]

Важной характеристикой PALB2 является его способность инициировать вспомогательный BRCA1-независимый путь гомологичной рекомбинации в составе комплекса PALB2-NF16. Таким образом, PALB2 служит резервным

механизмом запуска репарации ДНК с помощью гомологичной рекомбинации [37, 62].

Несмотря на то, что BRCA1-опосредованный запуск гомологичной рекомбинации является приоритетным, в клетках с нарушенной экспрессией *BRCA1 PALB2* выполняет важнейшую адаптационную роль и позволяет и сохранить возможность репарации ДЦР путем гомологичной рекомбинации [48].

Еще одно важное функциональное значение PALB2 было продемонстрировано в исследованиях Menzel et al., целью которого было изучение потенциальных модуляторов контрольных точек постсинтетической фазы клеточного цикла. В результате PALB2 был идентифицирован в качестве основного регулятора контрольной точки G2. Снижение экспрессии *PALB2* привело к нарушению регуляции и преждевременному восстановлению клеточного цикла. Позднее Simhadri et al. предложили новую концепцию, согласно которой PALB2 служит связующим звеном между BRCA1 и BRCA2 в контрольных точках G2/M [41, 51].

1.5. Строение и функции гена *CHEK2*

Checkpoint kinase 2 (CHEK2, Chk2) — белковый продукт гена *CHEK2*. Ген *CHEK2* относится к категории супрессоров опухолевого роста и располагается в локусе 22q12.1, содержит 14 экзонов. Серин-треониновая киназа CHEK2 является ядерным сигнальным фактором, который первично активируется в ответ на повреждение ДНК и играет важную роль в процессе запуска гомологичной рекомбинации. [18]

В структуре молекулы CHEK2 идентифицированы 3 основных функциональных домена: N-концевой кластерный домен SQ/TQ (аминокислотные остатки 20–75), FHA(fork head-associated)-домен (остатки 112–175), и серин-треониновый киназный домен (остатки 225–490).

Кластерный домен SQ/TQ представляет собой регуляторный участок, содержащий семь остатков серина или треонина, за которыми следуют

глутамин (мотивы SQ или TQ). Этот домен необходим для связывания с протеинкиназой ATM, которая инициирует активацию CHEK2 в ответ на воздействие генотоксических агентов, вызывающих ДЦР.

С помощью домена FHA происходит распознавание фосфотреонина и, как следствие, обеспечивается взаимодействие с другими фосфорилированными белками. FHA играет ведущую роль в активации CHEK2 и осуществлении передачи сигналов о повреждении ДНК через динамические белок-фосфопротеиновые взаимодействия. Кроме того, домен оказывает непосредственное влияние на функциональные мотивы самой молекулы CHEK2. В С-терминальной части CHEK2 располагается серин-треониновый киназный домен, который характеризуется высокой выраженной идентичностью с другими сигнальными киназами [18, 33, 35].

Основное физиологическое значение протеинкиназы CHEK2 отражается в ее посреднической роли в сигнальных путях, которые активируются в ответ на повреждение ДНК и напрямую воздействуют на нижестоящие эффекторы. Активация CHEK2 представляет собой сложный многоступенчатый динамический процесс, который инициируется ATM-опосредованным фосфорилированием сайтов N-концевого регуляторного домена [18, 45]

Первоначальное ATM-опосредованное фосфорилирование CHEK2 происходит исключительно в месте повреждения ДНК. В результате этого процесса происходит гомодимеризация и активация протеинкиназы CHEK2, которая в последствие быстро перемещается по нуклеоплазме, чтобы передавая сигнал о произошедшем повреждении ДНК на свои субстраты. Спектр идентифицированных в настоящее время субстратов киназы CHEK2 включает белки, участвующие в контроле клеточного цикла, такие как фосфатазы Cdc25A и Cdc25C, Plk3, транскрипционный фактор E2F1, а также белки системы гомологичной рекомбинации и регуляции апоптоза, включая p53. [18, 33, 38].

Таким образом, CHEK2 регулирует клеточное деление в условиях повреждения ДНК, а также киназа вовлечена в процессы модификации структуры ДНК, прогрессии клеточного цикла. Кроме того, CHEK2-

дефицитных клетках обнаруживаются дефекты в нескольких контрольных точках клеточного цикла, а также в процессах репарации ДЦР и, в частности, в апоптозе, инициированном в ответ на повреждение ДНК.

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования

2.1. Отбор лиц и формирование исследуемых групп

В исследование включены 50 пациенток с диагнозом РЯ (основная группа), получавших различные виды лечения в период с 2021 по 2023 год на базе ГБУЗ РК «Крымский республиканский онкологический клинический диспансер имени В.М. Ефетова», клиники Генезис, а также Центра Клинической онкологии и гематологии, г. Симферополь.

Критерии включения в группу исследования (наличие одного или более признаков) [6]:

- а) выявление заболевания в молодом возрасте (до 50 лет);
- б) наличие семейной истории заболеваемости злокачественными новообразованиями (ЗНО): ближайшие родственники (I-II степень родства) с подтвержденным онкологическим диагнозом, включая РМЖ, РЯ, ЗНО предстательной и поджелудочной железы;
- в) билатеральное поражение яичников;
- г) синхронные и/или метакронные сочетанные опухолевые поражения разной локализации;
- д) перманентное проживание в Крыму, а также проживание родственников в более, чем двух поколениях в Крыму;
- е) самоопределение пациентов к определенной этнической группе (крымские татары, славяне), а также принадлежность родственников в двух и более поколениях к указанной этнической группе
- ж) добровольное согласие на участие в исследовании.

Пациентки исключались из исследования в следующих случаях:

- а) отсутствие заключения гистологического исследования операционного материала с подтверждением факта опухолевого роста;
- б) принадлежность к этнической группе, не относящейся к исследуемым;
- в) недавняя иммиграция или временное пребывание на территории

Крыма;

г) отказ от участия в исследовании.

Первоначально была проведена работа с первичной медицинской документацией пациенток. Все пациентки прошли комплексное клинично-инструментальное обследование, включая определение уровней биохимических онкомаркеров в крови (СА-125, He4, расчет индекса ROMA), компьютерную томографию (КТ) головного мозга, органов грудной клетки, органов брюшной полости, забрюшинного пространства и малого таза, патоморфологическое исследование опухолевого материала, результаты которого учитывались при постановке диагноза и выборе тактики лечения.

Контрольная группа была сформирована из 50 здоровых женщин, соответствующих больным РЯ основной группы по возрасту, этнической составляющей, менструальной функции. Основным критерий включения в контрольную группу: отсутствие данных о наличии онкологической патологии у женщины, а также у ближайших родственников (I-III степень родства).

Все пациенты основной группы, а также здоровые лица, включенные в исследование, добровольно согласились на участие в проводимом исследовании, что в каждом случае было подтверждено документально подписанием информированного добровольного согласия, а также индивидуальным анкетированием.

Исследование было представлено на очередном заседании комитета по этике ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» и одобрено 7 июня 2022 года (протокол №6 от 7 июня 2022 г.).

2.2. Клинико-морфологическая характеристика исследуемых групп

Доминирующей этнической группой явилась славянская, на долю которой пришлось 84% (42/50) исследованных женщин основной группы и 39 и 78% (39/50) женщин контрольной группы.

Средний возраст пациенток основной группы и здоровых женщин контрольной группы составил $54,8 \pm 9,6$ и $53,1 \pm 9,3$ года соответственно;

различия и распределение по возрасту в исследуемых группах не значительны (таблица 4).

Таблица 4 – Возраст пациенток исследуемых групп

Возраст (в годах)	Основная n ₁ = 50		Контрольная n ₂ = 50		p
	Абс.	%	Абс.	%	
29-39	3	6	4	8	0,23
40-49	13	26	11	22	0,89
50-59	22	44	21	42	0,58
60-69	9	18	12	24	0,41
70-79	3	6	2	4	0,52
Средний возраст	54,8 ± 9,6		53,1 ± 9,3		0,89

Стадирование заболевания производилось, опираясь на критерии Международной федерации акушерства и гинекологии (International Federation of Gynecology and Obstetrics – FIGO), а также по системе Международной классификации ЗНО – TNM.

Распределение по стадиям заболевания основной группы неравномерное. У большей части больных диагноз был установлен на III стадии по FIGO (34/50; 68%). В свою очередь на долю I, II и IV стадии пришлось 18% (9/50), 4% (2/50) и 10% (5/50) соответственно. Во всех случаях принадлежность к IV стадии определялась наличием плеврального выпота с подтверждённым наличием опухолевых клеток по результатам цитологического исследования.

В 98% (49/50) случаях отмечается билатеральное поражение яичников. Морфологически абсолютно преобладали серозные карциномы (98%, 49/50) с различным гистологическим строением и степенью злокачественности. Определение степени злокачественности осуществлялось в процессе патоморфологического исследования согласно Ноттингемской модификации шкалы SRB с градацией опухолей по способности формирования тубулярных

структур, степени ядерного полиморфизма и количеству атипических митозов: низкой (Low Grade) – G1, высокой (High grade) G3 и умеренной – G2.

В частотности, 54% (27/50) опухолей характеризовались ростом серозной карциномы G3. Морфологическая картина характеризовалась полями разрастания инвазивной солидной опухоли с формированием крибриформных и ветвящихся папиллярных структур из клеток с умеренной эозинофильной цитоплазмой, плеоморфными ядрами вплоть до явлений анизонуклеоза, появления многодольчатых и безоарных ядер. На долю серозных карцином G1 и G2 пришлось 14% (1/50) и 30% (15/50) исследуемых опухолей.

В одном случае была выявлена эндометриоидная карцинома.

У 41 из 50 исследованных пациентов (82%) отмечается наличие семейного анамнеза по злокачественным новообразованиям, в частности – по РМЖ, РЯ, раку предстательной и поджелудочной железы.

Также, в группе исследования выделено 3 пациентов с первично-множественными ЗНО (сочетанный рак РЯ и РМЖ, рак эндометрия), у 2 из которых установлен диагноз первично-множественных метакронных ЗНО и у 1 – первично-множественного синхронного ЗНО.

2.3. Молекулярно-генетическое исследование

На втором этапе проводилось молекулярно-генетическое исследование лиц контрольной и основной групп.

При поступлении пациенток в онкологический стационар для проведения хирургического лечения или очередного курса лекарственной противоопухолевой терапии производился забор венозной крови для дальнейшего исследования. Женщины, принадлежащие к контрольной группе, для забора крови были приглашены отдельно.

Забор материала в объеме 2-3 мл осуществлялся натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в специальную вакуумную систему (пробирки, содержащие 6% раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты). При транспортировке и хранении образцов соблюдался

рекомендованный температурный режим: при +2 ... +8°C – хранение не более 24 ч. Для длительного хранения применен наиболее оптимальный температурный режим в –70°C.

Практическая часть исследования на базе кафедры общей и клинической патофизиологии, а также Центральной научно-исследовательской лаборатории Медицинского института им. С. И. Георгиевского.

Первоначально приводилось изолирование образцов ДНК из цельной крови с помощью спин-колонок с использованием наборов "Extract DNA Blood" («Евроген», Россия) с последующей оценкой концентрации выделенных нуклеиновых кислот.

На втором этапе выделенные образцы ДНК подверглись генотипированию методом мультиплексной аллель-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с последующей оценкой кривых плавления.

Постановка реакций проводилась в соответствии с рекомендациями производителя в двух параллельных пробирках. Состав смеси для реакций содержал один и тот же обратный праймер, но отличался по прямому праймеру.

Аmplификация проводилась по программе:

1 цикл – 95°C/2 минуты

45 циклов – 94°C /10 сек – 67°C/30 сек (регистрация).

Интерпретация результатов также проводилась в соответствии с рекомендациями производителя.

Для постановки real-time ПЦР был выбран набор реагентов «HRR-скрининг» («Тестген», Россия), включающий специфичные праймеры для обнаружения 16-ти мутаций в генах наследственной предрасположенности к РЯ и РМЖ – *BRCA1*, *BRCA2*, *CHECK2*, *PALB2*.

«HRR-скрининг» – один из наиболее емких наборов для детекции мутаций методом ПЦР, доступных на территории Российской Федерации. Помимо наиболее распространенных восьми мутаций, повышающих риск развития РЯ и РМЖ, набор включает праймеры для выявления восьми дополнительных мутаций, актуальных для евразийского региона (таблица 5).

Таблица 5 – Перечень и состав коммерческих наборов для выявления мутаций в генах наследственной предрасположенности к РМЖ и РЯ методом ПЦР.

Ген и мутация	Набор								
	Онко-генетика (ДНК-техно-логия)	ПФ-БИОЧИП (LabMed-Service)	Реал-бест генетика (Вектор-бест)	BRCA-скрининг (ИнтерЛаб-Сервис)	ГенТест (НОМОТЕК)	Пронто (Биохиммак)	HRR-скрининг (Тестген)	Пироскрин BRCA- скрин (Амплиценс)	
BRCA1	5382insC (5266dupC)	+	+	+	+	+	+	+	
	185delAG (68_69del)	+	+	+	+	+	+	+	
	300 T>G (181T>G)	+	+	+	+	+	-	+	
	4153delA	+	+	+	+	+	-	+	
	2080delA	+	-	+	+	+	-	+	
	3819delGTAAA	+	-	+	-	+	-	+	
	3875delGTGT	+	-	+	-	+	-	-	
	4158A>G	-	+	-	-	-	-	-	
	5251C>T	-	-	-	-	-	-	+	
	5161C>T	-	-	-	-	-	-	+	
4675G>A	-	-	-	-	-	-	+		
BRCA2	6174delT	+	+	+	+	+	+	-	
	3749dupA	-	-	-	-	-	-	+	
	961_962insAA	-	-	-	-	-	-	+	
CHEK	470T>C	-	-	-	-	-	-	+	
	1100delC	-	+	+	-	-	-	+	
	444+1G>A	-	-	+	-	-	-	+	
	893_897del	-	-	-	-	-	-	+	
NBS1 657del5	-	-	+	-	-	-	-	-	
PALB2 1592delT	-	-	-	-	-	-	+	-	

2.4. Анализ и обработка полученных результатов

В исследовании был применен метод сравнения клинико-морфологических характеристик у пациенток с выявленными мутациями и без них. Кроме того, проводилась оценка частоты встречаемости мутаций в основной и контрольной группе.

Статистический анализ полученной информации проводился с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics (IBM SPSS Statistics, version 23.0, IBM Corp, США) и программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, США).

Для выполнения сформулированных задач были созданы вариационные ряды с целью осуществления сравнительного анализа показателей основной и контрольной групп.

Количественные данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, а m – стандартная ошибка среднего значения. Также использовались интервальные выражения количественных данных. Оценка нормальности распределения изучаемых количественных признаков осуществлялась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Нормальным распределение признака считалось при показателе W -критерия $p \geq 0,1$. При негативном результате при оценке нормальности распределения в изучаемых выборках, а также при общем количестве наблюдений в сравниваемых выборках меньше 50, применялись непараметрические критерии.

При анализе различий качественных признаков в независимых выборках (пациенты с детектированными мутациями/при отсутствии мутаций, а также контрольная и основная группы) использовали метод составления таблиц сопряженности с применением критерия χ^2 Пирсона или точного критерия Фишера, когда математическое ожидание значений в любой из ячеек таблицы с заданными границами оказывалось ниже 5. Все различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. Результаты собственных исследований

3.1. Частота и спектр выявленных герминальных мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2* у больных РЯ и здоровых женщин

В ходе молекулярно-генетического исследования, проведенного в основной группе, у пациенток, принадлежащих к доминирующей славянской подгруппе (n=42) у 9 (21,4%), были детектированы исследуемые мутации в трех из четырех исследуемых генах (*BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*). Среди крымских татарок (n=8) носительницы исследуемых мутаций в основной группе не были выявлены, несмотря на наличие клинических признаков наследственной природы заболевания.

Исследуемая мутация *PALB2*c.1592delT в рамках данного исследования также не была детектирована.

6 мутаций выявлено в гене *BRCA1*: с.5266dupC (2/42; 4,8%), с.181T>G (1/42; 2,4%), с.68_69del (1/42; 2,4%), с.4035delA (2/42; 4,8%); в гене *BRCA2* выявлена одна мутация с.6174delT (1/42; 2,4%); в гене *CHEK2* выявлена мутация с.470T>C (2/42; 4,8%).

В контрольной группе было установлено носительство мутации *CHEK2* с.470T>C у четырех женщин (4/50, 8%). Одна женщина из группы контроля с выявленной мутацией *CHEK2* с.470T>C принадлежит к крымскотатарской этнической группе, что является уникальным случаем.

При исследовании контрольной группы мутации в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* не были обнаружены.

Наибольший вклад в развитие НРЯ в исследуемой группе принадлежит герминальным мутациям в гене *BRCA1*, на долю которых пришлось 66,7% выявленных мутаций, при этом «фаундер» мутация *BRCA1*c.5266dupC детектирована у двух пациенток (рисунок 4).

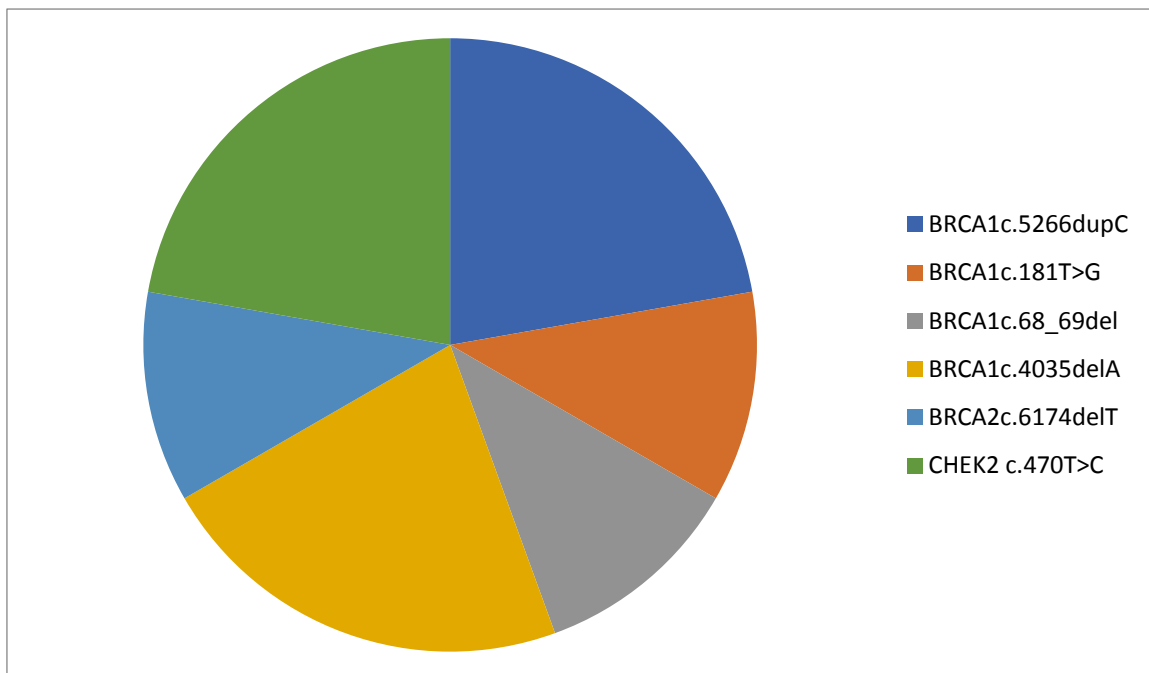


Рисунок 4 – Частота и спектр выявленных мутаций.

3.2. Клинические и патоморфологические характеристики НРЯ у женщин Республики Крым

Затем проведен сравнительный анализ клинико-морфологических характеристик в подгруппах пациентов с подтвержденным носительством мутаций *BRCA1* (с.5266dupC, с.181T>G, с.68_69del, с.4035delA), *BRCA2* (с.6174delT) и *CHEK2* (с.470T>C) мутациями ($n_1 = 9$) и без выявленных мутаций ($n_2 = 41$) (Таблица 6).

Таблица 6 – Сравнительная характеристика клинико-морфологических данных носительниц мутаций и пациенток без выявленных мутаций.

Показатели	<i>BRCA1</i> -, <i>BRCA2</i> - и <i>CHEK2</i> - ассоциированный НРЯ	Больные с клиническими признаками НРЯ	p
Число больных	$n_1 = 9$	$n_2 = 41$	–
Средний возраст	$47,7 \pm 8,4$	56.9 ± 10.0	0,48

Продолжение таблицы 6

Возраст манифестации, лет:			0,02
- до 50	6 (66,7%)	10 (24,4%)	
- после 50	3 (33,3%)	32 (75,6%)	
Степень дифференцировки опухоли			
G1	–	7 (17,0%)	0,50
G2	1 (11,1%)	15 (36,6%)	0,42
G3	8 (88,9%)	19 (46,3%)	0,04
Гистологический подтип			
Серозная карцинома	8 (88,9%)	41 (100%)	0,40
Эндометриоидная карцинома	1(11,1%)	–	0,03
Монолатеральный/билатеральный РЯ			
Монолатеральный	–	1 (2,45%)	0,40
Билатеральный	9 (100%)	40 (97,6%)	
Стадия заболевания по FIGO			
I	4 (44,4%)	5 (12,2%)	0,07
II	–	2 (4,9%)	0,79
III	5 (55,6%)	29 (70,7%)	0,62
IV	–	5 (12,2%)	0,62
Семейный анамнез (ЗНО у родственников I-II линии родства)			
Присутствует	9 (100%)	24 (58,6%)	0,004
Отсутствует	-	17 (41,4%)	
Первично-множественные синхронные и метакронные ЗНО			
Присутствуют	3 (33,3%)	–	0,003
Отсутствуют	6 (66,7%)	41 (100%)	

Несмотря на то, что различия среднего возраста сравниваемых групп не показали статистической значимости ($p=0,48$), сравнительный анализ возраста манифестации РЯ продемонстрировал, что группа носительниц герминальных мутаций характеризуется началом заболевания в более раннем возрасте ($p = 0,02$). Более подробный возрастной состав больных НРЯ и возраст дебюта заболевания представлены в таблицах 7 и 8 соответственно.

Таблица 7 – Возрастной состав пациентов с НРЯ

Возраст (в годах)	Носительницы мутаций $n_1 = 9$		Больные с клиническими признаками НРЯ $n_2 = 41$	
	Абс.	%	Абс.	%
29-39	1	11,1	2	4,9
40-49	5	55,6	8	19,5
50-59	2	22,2	20	48,8
60-69	1	11,1	8	19,5
70-79	0	–	3	7,3
Средний возраст	47,7 ± 8,4		56,9 ± 10	

Таблица 8 – Возраст манифестации НРЯ

Возраст (в годах)	Носительницы мутаций $n_1 = 9$		Больные с клиническими признаками НРЯ $n_2 = 41$	
	Абс.	%	Абс.	%
29-39	2	22,2	3	7,3
40-49	5	55,6	7	17,1
50-59	2	22,2	20	48,8
60-69	0	–	9	21,9
70-79	0	–	2	4,9

Таким образом, в группе носительниц мутаций в 77,8% (7/9) случаев НРЯ был выявлен в более молодом возрасте (до 50 лет), в то время как в группе пациенток без мутаций диагноз был установлен в возрасте до 50 лет всего в 24,4% (9/41) случаев ($p = 0,025$). Полученные данные соответствуют данным предшествующих исследований по изучению *BRCA1*-ассоциированного РЯ, возраст манифестации которого более молодой по сравнению со спорадическими случаями [9].

По данным клинико-морфологического исследования все *BRCA1*-, *BRCA2* и *CHEK2*-ассоциированные опухоли относились к I или III стадии по FIGO и патоморфологически были представлены вариантом серозной карциномы, однако статистически значимых различий между выборками пациенток было выявлено ($p=0,401$). Единственный случай эндометриодной карциномы был выявлен у носительницы мутации в гене *BRCA1*.

При сравнении выборок было установлено, что двустороннее поражение яичников отмечается наиболее часто вне зависимости от наличия исследуемых мутаций: 100% случаев среди носительниц мутаций и 97,6% среди пациенток с клиническими признаками НРЯ ($p = 0,40$).

Установлено статистически значимое влияние наличия герминальных мутаций на степень злокачественности опухоли. Так, в группе носительниц мутаций преобладали опухоли высокой степени злокачественности G3 – 88,9% ($p = 0,04$); в данной группе один случай характеризовался ростом опухоли умеренной злокачественности, в то время как G1-опухоли не были выявлены.

Полученные данные (преобладание билатерального поражения и серозных карцином вне зависимости от молекулярно-генетических характеристик, более агрессивные формы рака, ассоциированного с герминальными мутациями), соответствуют результатам проведенных ранее исследований спорадических и наследственных форм РЯ. Интересным является обнаружение *BRCA1*-ассоциированной эндометриодной карциномы, поскольку они характеризуются достаточно низкой частотой

встречаемости относительно серозных и муцинозных карцином, на долю которых приходится до 90% случаев РЯ [9].

В ходе исследования был изучен наследственная онкологическая история пациенток (данные получены из историй болезни и по результатам анкетирования). В сформированных анкетах пациенткам предлагалось отметить родственника или родственников с установленным онкологическим диагнозом, а также возраст его установления и гистологическую характеристику опухоли и степень родства. В случае, когда были сохранены данные первичной медицинской документации родственников (выписные эпикризы, заключения патоморфологических исследований и других клинико-инструментальных), они также были изучены.

Так, у всех носительниц мутаций был отмечен факт наличия отягощенной онкологической наследственности; в группе пациенток без выявленных мутаций в 58,6% (24/41) случаев также установлено наличие ЗНО у ближайших родственников.

Анализ различий между выборками по наличию или отсутствию отягощенной наследственности показал статистически значимые отличия ($p=0,04$). Так, ЗНО у родственников I-II линии родства было в большей степени ассоциировано с развитием РЯ в группе пациенток-носительниц мутаций. Наличие РМЖ у родственников I-II линии достоверно ассоциировано с наличием герминальных мутаций в исследуемых генах ($p = 0,008$).

Особенности наследственного онкологического анамнеза исследованных пациенток представлены в таблице 9.

При изучении наследственного онкологического анамнеза в группе носительниц мутаций была выявленная высокая частота РМЖ у матери (44,4%; 4/9). В одном случае диагноз РМЖ был установлен бабушке по материнской линии (11,1%) и тете по материнской линии пациентки (11,1%). Для больных с клиническими признаками НРЯ частота РМЖ у матери пациентки составила 12,1% (5/41), у бабушки по материнской линии – 4,9% (2/41), у сестры 2,4% (1/41).

Таблица 9 – Наследственный онкологический анамнез носительниц мутаций и пациенток без исследуемых мутаций

	Носительницы мутаций		Больные с клиническими признаками НРЯ		p
	Абс.	%	Абс.	%	
ЗНО яичников у родственников I-II линии	1	22,3	4	9,8	0,62
ЗНО молочных желез у родственников I-II линии	6	44,4	10	24,4	0,008
Опухоли другой локализации у родственников I-II линии	2	33,3	10	24,4	0,68

РЯ у матери был выявлен в одном случае у носительницы мутации (11,1%) и у двух пациенток (4,9%), у которых мутации не были детектированы (таблица 10).

При анализе различий между выборками установлено статистически значимое влияние герминальных мутаций в исследуемых генах на возникновение первично-множественных опухолевых поражений ($p = 0,003$). Так, в группе пациенток с клиническими признаками НРЯ первично-множественные синхронные и метакронные ЗНО не были обнаружены, в то время как у трех из девяти пациенток с верифицированными мутациями отмечается наличие первично-множественных ЗНО.

Таблица 10 – Встречаемость ЗНО у родственников пациенток с НРЯ

	Носительницы мутаций		Больные с клиническими признаками НРЯ	
	Абс.	%	Абс.	%
РМЖ				
Мама	4	44,4	5	12,1
Сестра	0	–	2	4,9
Бабушка (по материнской линии)	1	11,1	2	4,9
Другие родственники	1	11,1	1	2,4
РЯ				
Мама	1	11,1	2	4,9
Сестра	0	–	0	–
Бабушка (по материнской линии)	0	–	0	–
Другие родственники	0	–	2	4,9

Все выявленные случаи первично-множественных ЗНО были ассоциированы с мутациями в гене *BRCA1*, при этом два случая характеризовались сочетанным поражением РЯ и РМЖ (таблица 11).

Таблица 11 – Характеристика пациенток с первично-множественными ЗНО

Возраст, лет	Выявленная мутация	Локализация поражения	Время выявления	Первично выявленная опухоль
63	<i>BRCA1</i> c.5266dupC	РЯ	метахронное	Молочная железа
		РМЖ		
52	<i>BRCA1</i> c.68_69del	РЯ	синхронное	Молочная железа Яичники
		РМЖ		
44	<i>BRCA1</i> c.181T>G	РЯ	метахронное	Эндометрий
		Рак эндометрия		

Таким образом, носительство мутаций в исследуемых генах *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* у большей части пациенток патоморфологически проявлялось ростом серозных карцином высокой степени злокачественности и с низкой степенью опухолевой дифференцировки (G3). Клинически носительницы мутаций с диагнозом НРЯ характеризовались манифестацией заболевания в более раннем возрасте. Важной анамнестической характеристикой является высокая частота встречаемости онкологических заболеваний у кровных родственников I-II линии, а также повышенный риск развития первично-множественных синхронных и метахронных опухолевых поражений.

3.3. Клинические и патоморфологические характеристики НРЯ у носительниц мутаций в разных генах

РЯ характеризуется высокой молекулярно-генетической и клинικο-морфологической гетерогенностью, что было подтверждено по результатам проводимого исследования. С учетом выявленного спектра мутаций были охарактеризованы случаи НРЯ, ассоциированного с разными мутациями (таблица 12).

Таблица 12 – НРЯ, ассоциированный с мутациями в разных генах

Показатели	<i>BRCA1</i> - ассоциированный НРЯ	<i>BRCA2</i> - ассоциированный НРЯ	<i>CHEK2</i> - ассоцииро- ванный НРЯ
Число больных	6	1	2
Средний возраст, лет	45,0 ± 9,3	57	50,5 ± 2,12
Возраст манифестации			
- до 50	6	0	0
- после 50	0	1	2
Степень дифференцировки опухоли	G3	G3	G2/G3
Гистологический подтип	Серозная карцинома (5/6) Эндометриоидная карцинома (1/6)	Серозная карцинома	Серозная карцинома
Стадия	I (3/6)/ III (3/6)	III	I/III

Таким образом, случаи *BRCA1*-ассоциированного НРЯ характеризовались более ранним возрастом дебюта заболевания и абсолютным преобладанием

карцином высокой степени злокачественности и низким уровнем дифференцировки опухолевых клеток. Носительницы мутаций в генах *BRCA2* и *CHEK2* отличаются более старшим возрастом, что подчеркивает важность максимально полного учета критериев наследственной предрасположенности к заболеванию, а не пристального внимания исключительно к возрасту пациентки, при направлении на молекулярно-генетического исследования.

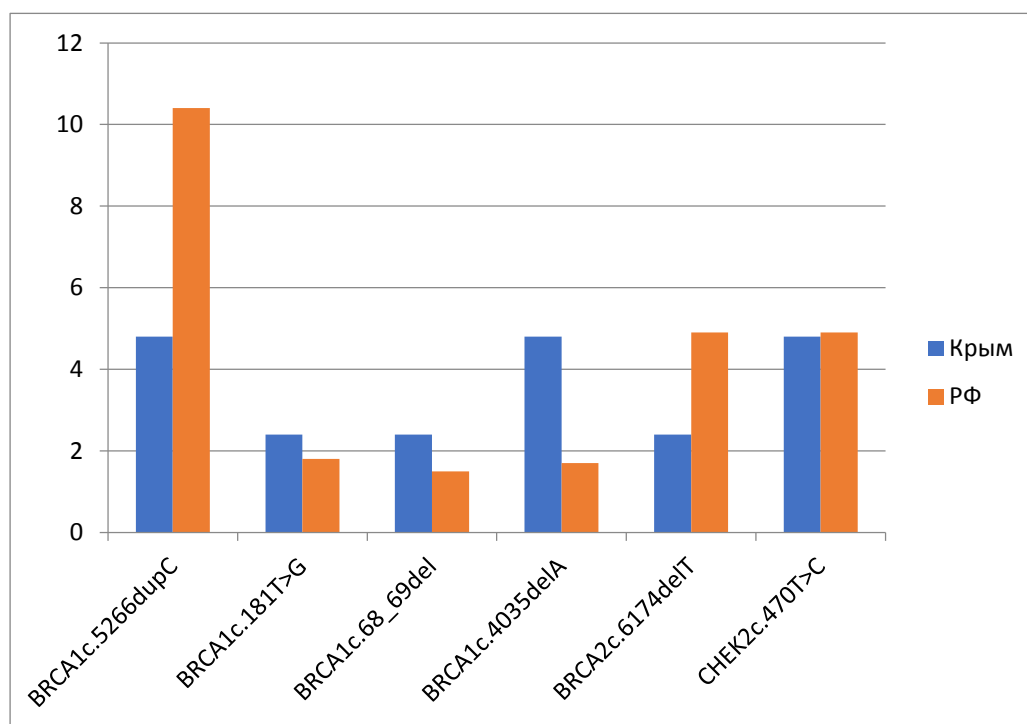
3.4. Популяционная характеристика полученных результатов

Наиболее распространенным среди российских пациентов славянского этноса является *BRCA*-ассоциированный РЯ, что прослеживается по результатам данного исследования: на долю мутаций в гене *BRCA1* пришлось 66,7% случаев. Так, «Фаундер»-мутация для женской части населения Российской Федерации *BRCA1*c.5266dupC была выявлена у двух пациенток (4,8%).

Детектированные у других пациенток мутации *BRCA1* с.181T>G, с.68_69del, с.4035delA, *BRCA2*с.6174delT и *CHEK2*с.470T>C также являются характерными и распространенными среди европейцев [9].

В целом, полученные результаты сопоставимы с тенденциями, характерными для российской популяции в целом, однако требуют продолжения исследований в более расширенных выборках (рисунок 5).

Рисунок 5. Частота встречаемости мутаций в генах *BRCA1* и *CHEK2* у крымских пациенток с НРЯ, принадлежащих к славянской этнической группе в сравнении с данными, полученными в других исследованиях по России [13].



В то время как вклад *BRCA1*-мутаций в увеличении риска развития РЯ подтвержден во множестве исследований, роль мутаций гена *CHEK2* продолжает изучаться. Так, выявленная в ходе исследования мутация *CHEK2c.470T>C* характеризуется неполной пенетрантностью, и до сегодняшнего дня не существует единой точки зрения на ее роль в повышении риска развития РЯ/ПМЖ [10]. Кроме того, герминальная мутация *CHEK2c.470T>C* была выявлена у 4 женщин из контрольной группы, одна из которых является крымской татаркой.

Суммарно мутация *CHEK2c.470T>C* была выявлена у 6 из 100 исследованных женщин (6%), что позволяет рекомендовать ее включения в обязательную молекулярно-диагностическую панель для крымских женщин и, в частности, для крымских татарок.

Заключение

РЯ до сегодняшнего дня остается серьезной проблемой современной медицины. Это связано с относительно бессимптомным течением заболевания на ранних стадиях, отсутствием эффективных скрининговых методов диагностики заболевания, быстрой скоростью прогрессии заболевания и метастазирования. Включение молекулярно-генетических методов диагностики заболевания в практическое здравоохранение является одним из важнейших этапов на пути разрешения части этих проблем.

Значимость проведенного исследования определяется, прежде всего, практической ценностью для региональной системы здравоохранения, поскольку способствует пониманию региональных особенностей генетики НРЯ. Выявление мутаций в генах, повышающих риск развития РЯ, имеет ключевое значение для формирования групп повышенного онкологического риска развития данной онкопатологии.

Обнаружение герминально-генной мутации до начала заболевания у клинически здоровых женщин является основанием для проведения более глубокой диагностики, динамического наблюдения и комплекса профилактических мер, а в случае возникновения РЯ позволяет предупредить его тяжелые последствия.

Для пациенток с уже дебютировавшим заболеванием данное исследование дает возможность верифицировать его предположительную наследственную природу, выбрать наиболее эффективный алгоритм хирургического, химиотерапевтического и поддерживающего таргетного лечения, которое позволит максимально продлить безрецидивную выживаемость пациентки, а также обозначить прогноз заболевания.

Детектированные в ходе исследования *BRCA1*, *BRCA2* и *CHEK2* мутации в славянской подгруппе соответствуют профилю мутаций, выявляемых на территории РФ, однако выявленная мутация *CHEK2*c.470T>C встречается достаточно редко и характеризуется неполной пенетрантностью. Тем не менее, в выборке изученных женщин данная мутация была выявлена в 6% случаев, что

превысило суммарную встречаемость «фаундер»-мутации *BRCA1*c.5266dupC (2%) в 3 раза. Случаи рака, ассоциированного с мутациями в этом гене, описаны спорадически, что подчеркивает особую важность изучения вклада мутации в этиопатогенез НРЯ.

Все также большой интерес вызывает крымскотатарская подгруппа пациентов. Мутации в группе крымских татарок с подтвержденным диагнозом НРЯ не были выявлены, несмотря на наличие клинических признаков наследственной природы заболевания. Однако большим событием является детекция мутации *CHEK2*c.470T>C у крымской татарки, принадлежащей к группе контроля.

Уже на данном этапе можно рекомендовать включение тестирования на носительство мутации *CHEK2*c.470T>C в обязательный диагностический перечень при диагностике или подозрении на НРЯ. Продолжение изучения вклада данной мутации в этиопатогенез НРЯ позволит сформировать клинические рекомендации по особенностям ведения *CHEK2*-ассоциированного РЯ.

Важно отметить, что негативный результат, полученный при проведении данного молекулярно-генетического исследования, не свидетельствует о принципиальном отсутствии генетической основы заболевания. Так, в рамках исследования таргетными были выбраны 16 мутаций, следовательно, для выявления других причин канцерогенеза необходимо расширять используемые методы диагностики.

Выводы

1. В ходе выполненного исследования среди женщин с установленным диагнозом рака яичников были выявлены мутации в гене *BRCA1*: с.5266dupC (2/42; 4,8%), с.181T>G (1/42; 2,4%), с.68_69del (1/42; 2,4%), с.4035delA (2/42; 4,8%); в гене *BRCA2* выявлена одна мутация с.6174delT (1/42; 2,4%); в гене *CHEK2* выявлена мутация с.470T>C (2/42; 4,8%).
2. Установлено, что носительство искомым мутаций у пациенток с РЯ крымского региона ассоциировано с более ранним возрастом манифестации, превалированием опухолей высокой степени злокачественности, а также риском формирования первично-множественных опухолевых поражений.
3. Все мутации были выявлены в доминантной славянской группе, среди больных крымских татарок носительницы мутаций не были выявлены.
4. В контрольной группе было установлено носительство мутации *CHEK2* с.470T>C у четырех женщин (4/50, 8%). Одна женщина из группы контроля с выявленной мутацией *CHEK2* с.470T>C принадлежит к крымскотатарской этнической группе, что является уникальным случаем, не описанным ранее в научной литературе.
5. Выявленные в исследовании мутации в гене *BRCA1* и *BRCA2* являются распространенными среди женской части населения России, однако лишь 2 из них включены в стандартную диагностическую панель при раке яичников.
6. Полученные результаты позволяют рекомендовать включение мутации *CHEK2* с.470T>C в обязательный диагностический перечень для крымских женщин, так как данная мутация характеризовалась самой высокой встречаемостью среди исследованных женщин.

Список сокращений и условных обозначений

ДЦР – двухцепочечные разрывы

ЗНО – злокачественное новообразование

НРЯ – наследственный рак яичников

НРМЖ – наследственный рак молочной железы

ПЦР – полимеразная цепная реакция

FIGO – Международная федерация акушерства и гинекологии

HR – гомологичная рекомбинация

NHEJ – негомологичная рекомбинация

Список использованной литературы

1. Бермишева, М.А., Зиннатуллина, Г.Ф., Гилязова, И.Р., Иванова, Е.А., Асадуллина, Д.Д., Потапо, С.О., Мустафин, А.Т., Ишемгулов, Р.Р., Павлов, В.Н., Ганцев, Ш.Х., Хуснутдинова, Э.К. Распространенность мутации с.5161С>Т гена BRCA1 у пациентов с онкологическими заболеваниями из Республики Башкортостан. / М.А. Бермишева, Г.Ф. Зиннатуллина, И.Р. Гилязова, Е.А. Иванова, Д.Д. Асадуллина, С.О. Потапо, А.Т. Мустафин, Р.Р. Ишемгулов, В.Н. Павлов, Ш.Х. Ганцев, Э.К. Хуснутдинова. // Успехи молекулярной биологии. – 2020. – №4. –С. 84–93
2. Бермишева, М.А., Зиннатуллина, Г.Ф., Хуснутдинова, Э.К. Частота выявления мутации 5382insC гена BRCA1. / М.А. Бермишева, Г.Ф. Зиннатуллина, Э.К. Хуснутдинова. // Вопросы онкологии. – 2008. – №1. – С. 31-34
3. Богомолова, О.А., Водолажский, Д.И., Шатова, Ю.С., Верескунова, М.И., Кучкина, Л.П., Луганская, Р.Г., Черникова, Е.Н., Бакулина, С.М. Герминальные мутации в генах BRCA1 и BRCA2 у пациенток Юга России с клиническими признаками наследственного рака молочной железы./ О.А. Богомолова, Д.И. Водолажский, Ю.С. Шатова, М.И. Верескунова, Л.П. Кучкина, Р.Г. Луганская, Е.Н. Черникова, С.М. Бакулина. // Злокачественные опухоли. – 2017. – №1. – С. 77-77
4. Гервас, П.А., Молоков, А.Ю., Панферова, Е.В., Писарева, Л.Ф., Чердынцева, Н.В. Этнические аспекты наследственного рака молочной железы. / П.А. Гервас, А.Ю. Молоков, Е.В. Панферова, Л.Ф. Писарева, Н.В. Чердынцева. // Сибирский онкологический журнал. – №2019 – №2. – С.102–108
5. Карелина, О.Б., Артымук, Н.В., Фетисова, Т.И. Факторы риска рака яичника и возможные превентивные стратегии. / О.Б. Карелина, Н.В. Артымук, Т.И. Фетисова. // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2018. – №3. – С. 91-96

6. Лаптиеv, С. А. , Корженевская, М. А., Имянитов, Е. Н. Молекулярно-генетический «портрет» рака молочной железы. / С.А. Лаптиеv, М.А. Корженевская, Е.Н. Имянитов // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. – 2017. – №2. – С. 12–22

7. Лаптиеv, С.А., Корженевская, М.А., Соколенко, А.П., Иевлева, А.Г., Имянитов, Е.Н. Медико-генетическое консультирование при наследственных формах рака молочной железы и рака яичников. / С.А. Лаптиеv, М.А. Корженевская, А.П. Соколенко, А.Г. Иевлева, Е.Н. Имянитов. // Учёные записки Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И. П. Павлова. – 2018. – №2. – С.7-18.

8. Лыжко, Н.А. Молекулярно-генетические механизмы инициации, промоции и прогрессии опухолей /Н.А. Лыжко // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – №4. – С. 7-17

9. Любченко, Л. Н., Батенева, Е. И. Медико-генетическое консультирование и ДНК-диагностика при наследственной предрасположенности к раку молочной железы и раку яичников./ Л.Н. Любченко, Е.И. Батенева. – М., ИГ РОНЦ 2014.– 00 с

10. Новикова, Е.И., Боженко, В.К., Кудинова, Е.А., Солодкий, В.А. Исследование влияния генетического варианта с.470Т>С в гене SNEK2 на повышение риска развития рака молочной железы у населения Российской Федерации. / Е.И. Новикова, В.К. Боженко, Е.А. Кудинова, В.А. Солодкий. // Успехи молекулярной онкологии. – 2021. – №1. – С. 26–31

11. Олексенко, В.В., Алиев, К.А. BRCA-ассоциированный рак молочной железы. / В.В. Олексенко, К.А. Алиев. // Таврический медико-биологический вестник. – 2017. – №4. – С. 162-168.

12. Пичигина, А.К., Лапий, Г.А., Лушникова, Е.Л. Значение морфологических и молекулярно-генетических исследований в прогнозе рецидивирования и метастазирования рака яичников. / А.К. Пичигина, Г.А. Лапий, Е.Л. Лушникова. Современные проблемы науки и образования. – 2019. – №5.

13. Строганова, А.М., Поспехова, Н.И., Головина, Д.А., Черепанова, И.С., Дранко, С.Л., Филиппова, М.Г. Анализ результатов многолетнего массового скрининга мутаций в генах BRCA1/2 у больных с различными типами злокачественных новообразований. РМЖ. / А.М, Строганова, Н.И. Поспехова, Д.А. Головина, Ч.С. Черепанова, С.Л. Дранко, М.Г. Филиппова. // Медицинское обозрение. – 2022. – №6. – С. 297-308.
14. Фаисханова, Р.Р., Прокофьева, Д.С., Хуснутдинова, Э.К., Сакаева, Д.Д., Гордиев, М.Г. Наследственный рак яичников: вклад изменений генов-кандидатов в патогенез заболевания. / Р.Р. Фаисханова, Д.С. Прокофьев, Э.К. Хуснутдинова, Д.Д. Сакаева, Гордиев Д.Д. // Медицинская генетика. – 2019. – №11. – С.3-13
15. Ahn, J., Urist, M., Prives, C. The Chk2 protein kinase. / J. Ahn, M. Urist, C Prives. // DNA Repair. – 2004. – V.3. – P. 1039–1047
16. Alberts B. et al. Molecular biology of the cell. / B. Alberts. // Garland Sci. – 2012. – V.5. – P. 1205–1212
17. Anantha R.W., Simhadri S., Foo T.K., Miao S., Liu J., Shen Z., et al. Functional and mutational landscapes of BRCA1 for homology-directed repair and therapy resistance. / R.W. Anantha, S. Simhadri, T.K. Foo , S. Miao, J. Liu, Z. Shen. // Elife. – 2017.– V.6. – e21350.
18. Bartek, J., Falck, J., Lukas, J. CHK2 kinase – a busy messenger. / J. Bartek, J. Falck, J. Lukas. // Nature reviews. Molecular cell biology. – 2001. – V.2. – P. 877–886.
19. Basu A.K., Nohmi T. Chemically-Induced DNA Damage, Mutagenesis, and Cancer. / A.K. Basu, T. Nohmi. // Int J Mol Sci. – 2018. – V.6. – P.17-67
20. Bertram M.J., Pereira-Smith O.M. Conservation of the MORF4 related gene family: identification of a new chromo domain subfamily and novel protein motif. /M.J. Bertram, O.M. Pereira-Smith. // Gene. – 2001. – V. 266. – P. 111–121.
21. Bleuyard J.Y., Fournier M., Nakato R., Couturier A.M., Katou Y., Ralf C., Hester S.S., Dominguez D., Rhodes D., Humphrey T.C., Shirahige K., Esashi F. MRG15-mediated tethering of PALB2 to unperturbed chromatin protects active

genes from genotoxic stress. / J.Y. Bleuyard, M. Fournier, R. Nakato, A.M. Couturier, Y. Katou, C. Ralf, S.S. Hester, D. Dominguez, D. Rhodes, T.C. Humphrey, K. Shirahige, F. Esashi. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2017. – V.29. – P. 7671–7676

22. Bowman B.R., Moure C.M., Kirtane B.M., Welschhans R.L., Tominaga K., Pereira-Smith O.M., et al. . Multipurpose MRG domain involved in cell senescence and proliferation exhibits structural homology to a DNA-interacting domain. / B.R. Bowman, C.M. Moure, B.M. Kirtane, R.L. Welschhans, K. Tominaga, O. M. Pereira-Smith. // *Structure*. – 2006. – V.14. –P. 151–1588.

23. Brodie K., Henderson B. Characterization of BRCA1 protein targeting, dynamics, and function at the centrosome: a role for the nuclear export signal, CRM1, and Aurora A kinase. / K. Brodie, B. Henderson. // *J Biol Chem*. – 2012. – V. 287. – P. 7701–7716.

24. Bunting S.F., et al. 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. / S.F. Bunting. // *Cell*. – 2010. – V.141. – P. 243–254.

25. Chatterjee N., Walker G.C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. / N. Chatterjee, G.C. Walker. // *Environ Mol Mutagen*. – 2017. –V.5. – p. 235-263

26. Christou C.M., Kyriacou K. BRCA1 and its network of interacting partners. / C.M. Christou, K. Kyriacou. // *Biology*. – 2013. – V.2. – P. 40–63

27. Cho K.R. Ovarian cancer update: lessons from morphology, molecules, and mice. / K.R. Cho.// *Arch. Pathol. Lab. Med*. – 2009. – V.11. – P. 1775–1781.

28. Chu-Xia Deng. Roles of BRCA1 in centrosome duplication. / Chu-Xia Deng.// *Oncogene*. – 2002. – V.21. – P.6222–6227

29. Dever, S., Golding, S.E., Rosenberg, E., et al. Mutations in the BRCT binding site of BRCA1 result in hyper-recombination. / S. Dever, S.E. Golding, E. Rosenberg. // *Aging*. – 2011. –V. 3. – P. 515–32.

30. Esashi, F., et al. CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. /F. Esashi. // *Nature*. – 2005. – V. 434. – P. 598–604.

31. Hayakawa, T., Zhang, F., Hayakawa, N., Ohtani, Y., Shinmyozu, K., Nakayama, J., Andreassen, P.R. MRG15 binds directly to PALB2 and stimulates homology-directed repair of chromosomal breaks. / T. Hayakawa, F. Zhang, N. Hayakawa, Y. Ohtani, K. Shinmyozu, J. Nakayama P.R. Andreassen. // J Cell Sci. – 2010. – V. 123(7). – 1124– 1130
32. Jervis, S., Song, H., Lee, A., Dicks, E., Tyrer, J., Harrington, P., Easton, D.F., Jacobs, I.J., Pharoah, P.P., Antoniou, A.C. Ovarian cancer familial relative risks by tumour subtypes and by known ovarian cancer genetic susceptibility variants. / S. Jervis, H. Song, A. Lee, E. Dicks, J. Tyrer, P. Harrington, D. F. Easton, I. J, Jacobs, P. P. Pharoah, A.C. Antoniou. // J Med Genet. – 2014. – V.51(2). – 108-113.
33. Kastan, M.B., Bartek, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. /M.B. Kastan, J. Bartek. // Nature. – 2004. – V. 432(7015). – P. 316-323
34. Knudson, A. et al. Two genetics hits (more or less) to cancer/ A. Knudson. // Nature Rev. Can. – 2001. – V.1. – P. 157–162
35. Li, J, Williams, B.L., Haire, L.F., Goldberg, M., Wilker, E., Durocher, D. et al. Structural and functional versatility of the FHA domain in DNA-damage signaling by the tumor suppressor kinase Chk2. / J. Li, B.L. Williams, L.F. Haire, M. Goldberg, E. Wilker, D. Durocher.// Mol Cell. – V. 9. – P. 1045–1054
36. Litvinov, S.V. The main repair pathways of double-strand breaks in the genomic DNA and interaction between them. /S.V. Litvinov.// Cytology and Genetics. – 2014. – V. 48(3). – P. 64–77
37. Luijsterburg, M.S., Typas, D., Caron, M.C., Wiegant, W.W., van den Heuvel, D., Boonen, R.A., et al. A PALB2-interacting domain in RNF168 couples homologous recombination to DNA break-induced chromatin ubiquitylation. / M.S. Luijsterburg, D. Typas, M.C. Caron, W. W. Wiegant, D. van den Heuvel, R.A. Boonen. // Elife. – 2017– V.6. – e20922.
38. Lukas, C., Falck, J., Bartkova, J., Bartek, J., Lukas, J. Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. / C. Lukas, J. Falck, J. Bartkova, J. Bartek, J. Lukas.// Nat Cell Biol. – 2003. – V. 5(3). – P. 255-60.

39. Ma, J, Cai, H, Wu, T, Sobhian, B, Huo, Y, Alcivar, A, et al. PALB2 interacts with KEAP1 to promote NRF2 nuclear accumulation and function. / J. Ma, H. Cai, T. Wu, B. Sobhian, Y. Huo, A. Alcivar. // *Mol Cell Biol.* – 2012. – V.32. – 1506–1517.
40. Martinez, J.S. BRCA2 regulates DMC1-mediated recombination through the BRC repeats. / J.S. Martinez, C. von Nicolai, T. Kim, Å. Ehlén, A.V. Mazin, S.C. Kowalczykowski, A. Carreira // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2016.– V. 113 (13). – P. 3515–3520
41. Menzel, T., Nahse-Kumpf, V., Kousholt, A.N., Klein, D.K., Lund-Andersen, C., Lees, M., et al. A genetic screen identifies BRCA2 and PALB2 as key regulators of G2 checkpoint maintenance. / T. Menzel, V. Nahse-Kumpf, A. N. Kousholt, D.K. Klein, C. Lund-Andersen, M. Lees.// *Embo Rep.* – 2011. – V. 12(7). –P. 705-712.
42. Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. / Y. Miki, J. Swensen, D. Shattuck-Eidens. // *Science.* – 1994. – V. 266. – P. 66–67
43. Moore, L.D., Le, T., Fan, G. DNA methylation and its basic function. / L.D. Moore, T. Le, G. Fan. // *Neuropsychopharmacology.* – 2013. – V. 38(1). – P. 23-38.
44. Murphy, A.K., Fitzgerald M., Ro, T., Kim J.H., Rabinowitsch A.I., Chowdhury, D., et al. .Phosphorylated RPA recruits PALB2 to stalled DNA replication forks to facilitate fork recovery. / A.K. Murphy, M. Fitzgerald, T. Ro, J.H. Kim, A. I. Rabinowitsch , D. Chowdhury, D. / Phosphorylated RPA recruits PALB2 to stalled DNA replication forks to facilitate fork recovery. // *J Cell Biol.* – 2014. – V. 206. – P. 493–507.
45. Narod, S.A., Foulkes ,W.D. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond / S.A. Narod, W.D. Foulkes. // *Nature Reviews Cancer.* – 2004. – Vol. 4(9). – P. 665–676
46. Oliver, A.W., Swift, S., Lord, C.J., Ashworth, A., Pearl, L.H. Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2. / A.W. Oliver, S. Swift, C.J. Lord, A. Ashworth, L.H. Pearl. // *EMBO Rep.* – 2009. – V.10. – P. 990–996

47. Park, J.Y., Zhang, F., Andreassen, P.R. PALB2: the hub of a network of tumor suppressors involved in DNA damage responses. / J.Y. Park, F. Zhang, P.R. Andreassen. // *Biochim Biophys Acta*. – 2014. – V.1. – P. 263–275
48. Porro, A., Sartori, A.A. Context matters: RNF168 connects with PALB2 to rewire homologous recombination in BRCA1 haploinsufficiency. / A. Porro, A.A. Sartori. // *Mol Cell*. – 2019. – V.73. – P. 1089–1091.
49. Orthwein, A., Noordermeer, S.M., Wilson, M.D., Landry, S., Enchev, R.I., Sherker, A., Munro, M., Pinder, J., Salsman, J., Dellaire, G., Xia, B., Peter, M., Durocher, D. A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells. / A. Orthwein, S.M. Noordermeer, M.D. Wilson, S. Landry, R.I. Enchev, A. Sherker, M. Munro, J. Pinder, J. Salsman, G. Dellaire, B. Xia, M. Peter, D. Durocher. // *Nature*. – 2015. – V. 528. – P. 422–426
50. San Filippo, J. Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination / J. San Filippo, P. Sung, H. Klein // *Annu. Rev. Biochem* . – 2008. – V. 77. – P. 229–57
51. Simhadri, S., Vincelli, G., Huo, Y., Misenko, S., Foo, T.K., Ahlskog, J., et al. PALB2 connects BRCA1 and BRCA2 in the G2/M checkpoint response. / S. Simhadri, G. Vincelli, Y. Huo, S. Misenko, T.K. Foo, J. Ahlskog. // *Oncogene*. – 2019. – V. 38. – P. 1585–1596.
52. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. / H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray. // *CA Cancer J Clin*. – 2021. – V. 3. – P. 209-249.
53. Sy, S.M. PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair /S.M. Sy, M.S. Huen, J. Chen // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – V. 106. – P. 7155–7160
54. Sy, S.M., Huen, M.S., Chen, J. MRG15 is a novel PALB2-interacting factor involved in homologous recombination. / S.M. Sy, M.S. Huen, J. Chen. // *J Biol Chem*. – 2009. – V.284. – P. 21127–31

55. Tarapore, P., Hanashiro, K., Fukasawa, K. Analysis of centrosome localization of BRCA1 and its activity in suppressing centrosomal aster formation. / P. Tarapore, K. Hanashiro, K. Fukasawa . // Cell Cycle. – 2012. – V. 11. – P. 2931–2946
56. Toss, A., Tomasello, C., Razzaboni, E. et al. Hereditary ovarian cancer: not only BRCA1 and 2 genes. /A. Toss, C. Tomasello, E. Razzaboni. // Biomed Res Int. – 2015. – 341723
57. Wu, W., Koike, A., Takeshita, T., et al. The ubiquitin E3 ligase activity of BRCA1 and its biological functions. / W. Wu, A. Koike, T. Takeshita. // Cell division. – 2008. – V.3. – 1
58. Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K., Ohashi, A., Wu, J., Christ, N., et al. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. / B. Xia, Q. Sheng, K. Nakanishi, A. Ohashi, J. Wu, N. Christ. // Mol. Cell. – 2006. – V. 22. – P. 719–729
59. Yang, H., et al. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. /H. Yang. // Science. – 2002. – V.297. – P. 1837–1848
60. Zhang, F., Fan, Q., Ren, K., Andreassen, P.R. PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. / F. Zhang, Q. Fan, K. Ren, P. R. Andreassen.// Mol Cancer Res. – 2009. – V.7. – P. 1110–1118
61. Zhang, F., et al. PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. / F. Zhang.// Curr Biol. – 2009. – V.19. – P. 524–529
62. Zong, D., Adam, S., Wang, Y., Sasanuma, H., Callen, E., Murga, M., et al. BRCA1 Haploinsufficiency is masked by RNF168-mediated chromatin ubiquitylation. / D. Zong , S. Adam, Y. Wang , H. Sasanuma, E. Callen, M. Murga.// Mol Cell. – 2019. – V.73. – P. 1267–1281