



¹ Клинический
онкологический
диспансер № 1,
Краснодар

² Кубанский
государственный
медицинский
университет

Генетические исследования крови и ротовой жидкости у женщин с *BRCA*-мутацией, больных раком молочной железы, и их родственников

А.С. Шатохина¹, М.Г. Леонов, д.м.н.², С.Д. Белоусова²,
А.А. Шатохин², С.А. Барскова¹

Адрес для переписки: Михаил Генрихович Леонов, novonko@yandex.ru

Для цитирования: Шатохина А.С., Леонов М.Г., Белоусова С.Д. и др. Генетические исследования крови и ротовой жидкости у женщин с *BRCA*-мутацией, больных раком молочной железы, и их родственников. Эффективная фармакотерапия. 2025; 21 (9): 36–38.

DOI 10.33978/2307-3586-2025-21-9-36-38

*У обследованных лиц с семейным анамнезом заболевания, но без клинических признаков рака молочной железы, по результатам скринингового исследования слюны выявлены ассоциированные с опухолью мутации в гене *BRCA1*, что может представлять информацию для раннего выявления, оценки молекулярной гетерогенности заболевания, его прогноза. Сочетание параллельных исследований слюны и крови может стать основой разработки эффективных тактик скрининговых и ранних диагностических исследований с использованием неинвазивных методов.*

Ключевые слова: мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*, рак молочной железы, генетическое тестирование слюны

Введение

В процессе разработки индивидуального профиля риска развития рака молочной железы (РМЖ) в семьях с сильными паттернами РМЖ были идентифицированы два гена восприимчивости к этому заболеванию – *BRCA1* и *BRCA2*. Эти гены кодируют белки-супрессоры опухоли, мутации которых индуцируют от 25 до 50% случаев наследственного РМЖ и могут быть обнаружены как у женщин, так и у мужчин [1–3]. Последние десятилетия изучение генетических аспектов злокачественных новообразований молочной железы в большей части было направлено на анализ *BRCA1/2*-мутаций. Гены-супрессоры опухолей *BRCA1/2* являются двумя основными генами предрасположенности к РМЖ и раку яичников. И было показано, что мутации в этих генах вносят вклад в патогенез рака груди и яичников. Хорошо известно, что значительная часть случаев наследственного РМЖ вызвана дефектами генов высокой пенетрантности *BRCA1* [4], *BRCA2* и *TP53* [5]. Несколько генов промежуточной пенетрантности (*CHEK2*, *ATM*, *PALB2* и *RAD50*) ответственны примерно за 5% случаев РМЖ [6–8]. Современным трендом в диагностике РМЖ является разработка неинвазивных и малоинвазивных методик. В настоящее время самая инновационная диагностическая методика в медицинской онкологии – это жидкост-

ная биопсия [9]. Она способна преодолеть ограничения биопсии тканей. Компоненты биоматериала жидкостной биопсии представляют собой белки; пептиды; метаболиты; гормоны; антитела; цитокины и аминокислоты, содержащиеся в биожидкостях; циркулирующие опухолевые клетки; внеклеточные циркулирующие опухолевые нуклеиновые кислоты, располагающиеся в экзосомах, микровезикулах и тромбоцитах. Исследования выполняются на различных биологических жидкостях, извлеченных неинвазивным способом. Белки и нуклеиновые кислоты, связанные с раковыми клетками, были обнаружены в плазме и сыворотке крови, бронхоальвеолярной, спинномозговой [10] и других жидкостях тела человека. Эти нуклеиновые кислоты и белки используются в качестве молекулярных маркеров для ранней диагностики онкологических заболеваний [11], маркеров рецидивирования [12–14], метастазирования, выживаемости и прогноза заболевания [15, 16]. Возникновение злокачественных новообразований в молодом возрасте позволяет предполагать наличие генетической предрасположенности к РМЖ у пациенток данной группы. При имеющейся предрасположенности риск его развития существенно выше при наличииотягощенного семейного анамнеза, а максимальный риск отмечен для носителей значимых терминальных мутаций [17]. Приблизительно в 5% случа-



ев РМЖ возникает на фоне носительства терминальных мутаций генов *BRCA1/2*. На долю мутаций в гене *BRCA1* приходится 84%, в гене *BRCA2* – только 0,5%.

Клинико-лабораторное исследование генетических маркеров у пациентов с наследственными формами рака имеет большое значение в диагностике и выборе оптимального лекарственного лечения. Итогом проведения таких исследований должна становиться разработка для пациента и членов его семьи индивидуальных рекомендаций по профилактике, ранней диагностике и лечению различных категорий наследственного РМЖ.

Цель исследования – определить диагностические критерии венозной крови и ротовой жидкости у пациенток с *BRCA*-ассоциированным РМЖ.

Материал и методы

В исследование включены две группы обследуемых. Первая группа – 30 женщин с диагностированным *BRCA*-ассоциированным РМЖ от 35 до 60 лет. Средний возраст составил $43,2 \pm 0,7$ года. Вторая группа – 15 женщин, ближайших родственниц больных *BRCA*-ассоциированным РМЖ. Возраст обследуемых в этой группе был от 18 до 75 лет. Средний возраст составил $31,6 \pm 0,9$ года. Всем обследуемым женщинам проведено исследование крови и слюны. Взятие, предобработку и хранение биологического материала для исследований генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском развития онкопатологии, проводили в соответствии с инструкцией к комплексу для выделения ДНК. Цельную венозную периферическую кровь, полученную путем венепункции, собирали в пластиковые пробирки объемом 4,0 мл, содержащие в качестве антикоагулянта ЭДТА. Образцы хранили до проведения исследования не более 2–4 часов при температуре от 2 до 8 °C.

Сбор образцов ротовой жидкости (слюны) производили сами обследуемые пациенты в предоставленный стерильный пластиковый контейнер с закрывающейся крышкой. За два часа до сбора слюны исследуемые пациенты не принимали никакой пищи или напитков (за исключением чистой воды).

Непосредственно перед сбором слюны пациентам было необходимо выпить небольшое количество воды (до 200 мл). За пять минут до сбора ротовой жидкости участники прополаскивали рот водой. Затем нестимулированную слюну собирали пассивным слюноотделением в отсутствие жевательных движений в стерильные пластиковые контейнеры на 10 мл.

Сбор образцов проводился утром с 9 до 11 часов, чтобы свести к минимуму влияние циркадного ритма на секрецию, и длился от 10 до 15 минут. Процедура проводилась в комнате, где исследуемые находились в сидячем положении, слегка наклонив голову вниз, с минимальными движениями лица и губ в расслабленном положении на протяжении всей процедуры, чтобы избежать стресса. От каждого участника было получено от 3 до 6 мл ротовой жидкости. Чтобы образец соответствовал критериям исследования, он не должен был иметь признаков присутствия крови. В этой связи все образцы были проверены путем визуального осмотра, и в исследование не были включены те, где обнаружили признаки, указывающие на их загрязнение кровью. Сразу после сбора образцы

ротовой жидкости (слюны) центрифугировали (скорость 8 000 оборотов в минуту, время – 15 минут) для удаления нежелательных частиц (например, клеток), затем супернатант собирали и разделяли на аликваты, удаляя осадок. Применяли набор реагентов «ОнкоГенетика», использующих эффект флуоресценции, производства ООО «НПО ДНК-Технология» (Россия) для выделения ДНК из периферической крови и ротовой жидкости (слюны) для выявления наследственных мутаций 185delAG, 2080delA, 4153delA, 5382insC, с.3700_3704delGTAAA, с.3756_3759delGTCT, T300G в гене человека *BRCA1* и 6174delT в *BRCA2* методом ПЦР. Подготовку к ПЦР проводили с использованием ПЦР-боксов. Набор реагентов «ОнкоГенетика» включает смеси для амплификации, специфичные для каждого генетического полиморфизма, и положительные контрольные образцы.

Результаты и их обсуждение

Пригодность слюны в качестве альтернативного источника геномной ДНК для идентификации зародышевых мутаций в генах *BRCA1/2* с помощью секвенирования следующего поколения не вызывает сомнений. У обследованных лиц с семейным анамнезом заболевания, но без клинических признаков РМЖ, по результатам скринингового исследования слюны выявлены ассоциированные с опухолью мутации в генах *BRCA*, что может предоставить информацию для раннего выявления, оценки молекулярной гетерогенности заболевания и его прогноза. Сочетание параллельных исследований слюны и крови может стать основой разработки эффективных тактик скрининговых и ранних диагностических исследований с использованием неинвазивных методов.

В первой группе обследуемых у больных с *BRCA*-ассоциированным РМЖ результаты ПЦР-диагностики на наличие указанных мутаций в венозной крови и ротовой жидкости (слюны) совпали в 100% случаев. Во второй группе обследованных родственников больных (женщины первой линии родства – дочери пациенток) была подтверждена мутация методом ПЦР крови. При проведении исследования слюны также была выявлена мутация *BRCA1* у 15 из 15 обследуемых этой группы. *BRCA2* мутаций среди обследуемых (в первой и второй группах) выявлено не было.

Генетическое тестирование для подтверждения наличия наследственных мутаций в этих генах поможет пациентам принять надлежащие профилактические меры, что приведет к меньшему количеству смертей от рака. Использование слюны в генетическом тестировании реально из-за ее лучшей транспортной стабильности по сравнению со стабильностью крови. Сравнительные исследования, проведенные нами на образцах слюны и крови от доноров, говорят о 100% совпадении результатов генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов. Идентификация патогенных мутаций зародышевой линии является широко распространенным инструментом для прогнозирования риска развития наследственного рака.

Еще одно важное преимущество, связанное со слюной как источником геномной ДНК, – ее стабильность при хранении и транспортировке. Кровь необходимо хранить в холодильнике перед обработкой для извлечения ДНК, а условия



хранения и транспортировки могут отрицательно повлиять на выход и общее качество экстрагированной ДНК.

Заключение

У обследованных лиц с семейным анамнезом заболевания, но без клинических признаков РМЖ, по результатам скринингового исследования слюны выявлены ассоциированные с опухолью мутации в гене *BRCA1*, что может представлять информацию для раннего выявления, оценки молекулярной гетерогенности заболевания, его прогноза. Сочетание с параллельным исследованием слюны и крови

может стать основой разработки эффективных тактик скрининговых и ранних диагностических исследований. Таким образом, генетическое тестирование изменений в генах *BRCA1/2* может использоваться для прогнозирования индивидуального риска развития РМЖ у пациентов с семейным анамнезом наследственного рака груди. Исследование мутации в генах *BRCA1/2* в качестве маркеров генетических признаков, ассоциированных с РМЖ, показало в 100% случаев совпадение результатов исследования периферической венозной крови и ротовой жидкости. ☺

Литература

1. Easton D.F. How many more breast cancer predisposition genes are there? *Breast Cancer Res.* 1999; 1 (1): 14–17.
2. Kobayashi H., Ohno S., Sasaki Y., Matsuura M. Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (review). *Oncol. Rep.* 2013; 30 (3): 1019–1029.
3. Michailidou K., Beesley J., Lindstrom S., et al. Genome-wide association analysis of more than 120 000 individuals identifies 15 new susceptibility loci for breast cancer. *Nat. Genet.* 2015; 47 (4): 373–380.
4. Feunteun J. Breast cancer and genetic instability: the molecules behind the scenes. *Mol. Med. Today.* 1998; 4 (6): 263–267.
5. Eyfjörd J.E., Thorlacius S., Valgardsdottir R., et al. TP53 abnormalities and genetic instability in breast cancer. *Acta Oncol.* 1995; 34 (5): 663–667.
6. Hsu H.M., Wang H.C., Chen S.T., et al. Breast cancer risk is associated with the genes encoding the DNA double-strand break repair Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2007; 16 (10): 2024–2032.
7. Turnpenny P., Ellard S. *Emerging elements of human genetics*. 13-th ed. – PA. Churchill Livingstone Elsevier, 2009. 423 p.
8. Le Calvez-Kelm F., Lesueur F., Damiola F., et al. Rare, evolutionarily unlikely missense substitutions in CHEK2 contribute to breast cancer susceptibility: results from a breast cancer family registry case-control mutation-screening study. *Breast Cancer Res.* 2011; 13 (1): R6.
9. Crowley E., Di Nicolantonio F., Loupakis F., Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2013; 10 (8): 472–484.
10. De Bont J.M., van Doorn J., Reddingius R.E., et al. Various components of the insulin-like growth factor system in tumor tissue, cerebrospinal fluid and peripheral blood of pediatric medulloblastoma and ependymoma patients. *Int. J. Cancer.* 2008; 123 (3): 594–600.
11. Johnson P.J., Lo Y.M. Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease. *Clin. Chem.* 2002; 48 (8): 1186–1312.
12. Honma H., Kanda T., Ito H., et al. Squamous cell carcinoma-antigen messenger RNA level in peripheral blood predicts recurrence after resection in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Surgery.* 2006; 139 (5): 678–685.
13. El-Abd E., El-Tahan R., Fahmy L., et al. Serum metastasis mRNA is an important survival predictor in breast cancer. *Br. J. Biomed. Sci.* 2008; 65 (2): 90–94.
14. Vborzanger-Rousselot N., Goehrig D., Journe F., et al. Increased Dickkopf-1 expression in breast cancer bone metastases. *Br. J. Cancer.* 2007; 97 (7): 964–970.
15. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы. *Практическая онкология.* 2010; 11: 258–266.
16. Lalwani N., Prasad S.R., Vikram R., et al. Histologic, molecular and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment. *Radiographics.* 2011; 31 (3): 625–646.
17. Пушкарев А.В., Меньшиков К.В., Пушкарев В.А., Султанбаев А.В. и др. Роль наследственных факторов в патогенезе рака молочной железы. *Медицинский вестник Башкортостана.* 2020; 15 (2): 70–78.

Genetic Studies of Blood and Oral Fluid in Women with BRCA Mutation, Breast Cancer Patients, and their Relatives

A.S. Shatokhina¹, M.G. Leonov, PhD², S.D. Belousova², A.A. Shatokhin², S.A. Barskova¹

¹ Clinical Oncological Dispensary No 1, Krasnodar

² Kuban State Medical University

Contact person: Mikhail G. Leonov, novonko@yandex.ru

In examined individuals with a family history of the disease, but without clinical signs of breast cancer, the results of screening saliva revealed tumor-associated mutations in the BRCA1 genes, which may provide information for early detection, assessment of the molecular heterogeneity of the disease, and its prognosis. The combination of parallel studies of saliva and blood may form the basis for the development of effective tactics of screening and early diagnostic studies using non-invasive methods.

Keywords: mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes, breast cancer, genetic testing of saliva