

ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ СЛЮНЫ ДЛЯ СКРИНИНГА И РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Шатохина А.С.^{1,2}, Быков И.М.¹, Попов К.А.¹, Опацкий А.А.³, Смоленская Н.В.⁴, Курзанов А.Н.¹

¹ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Краснодар, e-mail: kurzanov@mail.ru;

²ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер №1» Министерства здравоохранения Краснодарского края, Краснодар;

³Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В. Очаповского Министерства здравоохранения Краснодарского края, Краснодар;

⁴ГБУЗ «ГП №7 г. Краснодара» МЗ Краснодарского края, Краснодар

Целью исследования явилось изучение возможности генетического тестирования слюны (ротовой жидкости) для скрининга рака молочной железы. В исследовании приняли участие 20 человек. У 10 женщин с известными мутациями в гене BRCA1 было проведено сравнение ДНК, выделенной из образцов крови и ДНК из слюны с точки зрения обнаружения мутаций зародышевой линии. Сравнение ДНК, выделенной из образцов крови и ДНК из слюны людей с известными мутациями в локусах BRCA1 продемонстрировало наличие идентичных мутаций BRCA1 в ДНК из слюны и крови в 100% наблюдений. Еще у 10 обследованных проведено скрининговое исследование слюны у лиц с семейным анамнезом рака молочной железы, но без клинических признаков заболевания для выявления ассоциированных с опухолью мутаций в гене BRCA1. Материал для исследования генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском развития рака молочной железы была ДНК, выделенная из слюны/ротовой жидкости и венозной крови. Для генетического тестирования образцов биоматериала применяли набор реагентов «ОнкоГенетика», производства ООО «НПО ДНК-Технология». Качественные и количественные исследования ДНК проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. По результатам проведенного скринингового исследования слюны у 30 % обследованных лиц с семейным анамнезом заболевания, но без клинических признаков РМЖ, выявлены ассоциированные с опухолью мутации в гене BRCA1. Последующее исследование венозной крови лиц, у которых были обнаружены мутации в гене BRCA1 по данным генетического тестирования слюны, во всех анализируемых случаях подтвердило наличие идентичных мутаций в гене BRCA1 в образцах крови. Предварительные результаты исследования свидетельствуют, что скрининговое исследование слюны может предоставить информацию о наличии у близких родственников пациентов, с диагностированным раком молочной железы, мутаций в генах, ассоциированных с предрасположенностью к данному виду рака, что важно для раннего выявления и оценки молекулярной гетерогенности заболевания.

Ключевые слова: рак молочной железы, ген BRCA1, генетические исследования слюны.

POSSIBILITY AND OUTLOOK OF SALIVA GENETIC TESTINGS FOR SCREENING AND EARLY DIAGNOSTICS OF BREAST CANCER

Shatokhina A.S.^{1,2}, Bykov I.M.¹, Popov K.A.¹, Opatsky A.A.³, Smolenskaya N.V.⁴, Kurzanov A.N.¹

¹Kuban State Medical University of the Health Ministry of the Russian Federation, Krasnodar, e-mail: kurzanov@mail.ru;

²City Cancer Hospital №1 of the Health Ministry of the Krasnodar Region, Krasnodar;

³Research Institute – Regional Clinical Hospital № 1 named after prof. S.V. Ochapovsky of the Health Ministry of the Krasnodar Region, Krasnodar;

⁴City Hospital №7 of the Health Ministry of the Krasnodar Region, Krasnodar

The aim of the study was to explore the possibility of genetic testing of saliva (oral fluid) for breast cancer screening. 20 people participated in the study. In 10 people with known mutations in the BRCA1 gene, DNA isolated from blood samples and DNA from saliva were compared in terms of detecting germline mutations. Comparison of DNA isolated from blood samples and DNA from saliva of people with known mutations in BRCA1 loci demonstrated the presence of identical BRCA1 mutations in DNA from saliva and blood in 100% of observations. Another 10 examined patients underwent saliva screening studies in individuals with a family history of breast cancer, but without clinical signs of the disease, to identify tumor-associated mutations in the

BRCA1 gene. The material for the study of genetic polymorphisms associated with the risk of breast cancer was DNA isolated from saliva/oral fluid and venous blood. A set of OncoGenetics reagents manufactured by NPO DNA Technology LLC was used for genetic testing of biomaterial samples. Qualitative and quantitative DNA studies were performed by polymerase chain reaction in real time. According to the results of a saliva screening study, 30% of the examined individuals with a family history of the disease, but without clinical signs of breast cancer, revealed tumor-associated mutations in the BRCA1 gene. A subsequent study of the venous blood of individuals who had mutations in the BRCA1 gene according to genetic testing of saliva, in all analyzed cases confirmed the presence of identical mutations in the BRCA1 gene in blood samples. The results of the study indicate that saliva screening can provide information about the presence of mutations in genes associated with predisposition to this type of cancer in close relatives of patients diagnosed with breast cancer, which is important for early detection and assessment of the molecular heterogeneity of the disease.

Keywords: breast cancer, gene BRCA1, genetic testing of saliva.

Рак молочной железы (PMЖ) является наиболее распространенным злокачественным новообразованием у женщин. Каждый год в мире более двух миллионов женщин заболевают PMЖ, и уровень заболеваемости увеличивается [1]. В России, в 2023 г. выявлено 77 тысяч новых случаев заболевания PMЖ, сообщил ТАСС главный онколог Минздрава РФ, А.Д. Каприн. Из-за прогресса в скрининге, диагностике и лечении PMЖ в последние годы, уровень смертности постепенно снижается, особенно среди тех, у кого рак был обнаружен на ранней стадии [2; 3]. На протяжении десятилетий программы профилактики PMЖ следовали традиционному подходу при котором каждый пациент проходил одинаковый тип скрининга. На ранних этапах скрининга PMЖ маммография была включена в стандартные программы исследования. Однако традиционный подход в части случаев может оказаться небезвредным [4]. Все больше внимания начинают привлекать новые методы более персонализированного подхода к адаптации методов скрининга PMЖ для каждого пациента в зависимости от его уровня риска. В настоящее время национальные программы скрининга PMЖ не персонализированы и индивидуальные риски не принимаются во внимание. Тем не менее, оценка маммографической плотности молочной железы, структурные особенности, семейный анамнез и генетические варианты предрасположенности к PMЖ хорошо известны как серьезные факторы риска. Что касается знания нескольких факторов риска, существует острая необходимость в индивидуальном подходе к скринингу.

До 25% случаев PMЖ могут быть наследственными, причем 20% этих случаев связаны с дефектами высокопенетрантных генов, таких как BRCA1 и BRCA2 [5]. Открытие клинически значимых мутаций, способствующих развитию PMЖ, является важным шагом в развитии молекулярной онкологии, поскольку эти мутации приводят к возникновению гетерогенных опухолей, различающихся по своему происхождению. Эти мутации играют значительную роль в прогрессировании заболевания и в настоящее время подлежат генетическому тестированию и лечению препаратами группы PARP-ингибиторов [6]. Выявление мутаций BRCA1/2 у больных PMЖ определяет необходимость обследования их родственников для выявления здоровых носителей мутации BRCA1/2 и обеспечения

диагностики злокачественных новообразований на ранних стадиях, когда лечение наиболее эффективно. Наличие клинически значимых мутаций BRCA1/2 позволяет определить пациентов, которым может быть показана терапия PARP-ингибиторами, воздействующими на генетическую составляющую опухолевых клеток. Анализ мутаций в генах BRCA1/2 предусмотрен Программой государственных гарантий с 2020 года и во многих регионах включен в тарифы ОМС. Подтвержденные в настоящее время общие генетические вариации были обобщены в моделях прогнозирования риска и дают возможность оценить осуществимость программ раннего выявления и скрининга.

Цель исследования: изучить возможности генетического тестирования слюны (ротовой жидкости) для скрининга рака молочной железы.

Материал и методы исследования. Исследование проведено на базе ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер №1» Министерства здравоохранения Краснодарского края и ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» МЗ РФ.

В исследовании приняли участие 20 человек. Средний возраст исследуемых составил $51,9 \pm 10,3$ года. У 10 разных женщин с известными мутациями в локусах BRCA1 было проведено сравнение ДНК, выделенной из образцов крови, и ДНК из слюны с точки зрения обнаружения мутаций зародышевой линии. Еще у 10 обследованных проведено скрининговое исследование слюны у лиц с семейным анамнезом РМЖ для выявления ассоциированных с опухолью мутаций в гене BRCA1. Близкие родственники без клинических признаков РМЖ были из семей, в которых одна женщина имела в анамнезе РМЖ. Последующее исследование венозной крови осуществлялось у лиц, у которых были обнаружены мутации в гене BRCA1 по данным генетического тестирования слюны. Образец цельной венозной периферической крови, полученный путем венепункции, собирали в пластиковые пробирки объемом 10,0 мл (Becton Dickinson), содержащие в качестве антикоагулянта К2ЭДТА. Взятие, предобработку и хранение ротовой жидкости и венозной крови для исследований генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском развития онкопатологии проводили в соответствии с инструкцией к комплекту для выделения ДНК из биологического материала. Сбор образцов слюны (ротовой жидкости) производили сами обследуемые в предоставленный стерильный пластиковый контейнер с завинчивающейся крышкой. Все они получили подробную информацию в устной и письменной форме о целях и протоколе исследования, процедуре сбора слюны, а также добровольно подписали письменное согласие на участие в данном исследовании. За два часа до сбора слюны исследуемые женщины не принимали никакой пищи или напитков (за исключением чистой воды). За пять минут до сбора ротовой жидкости обследуемые прополаскивали рот водой. Затем нестимулированную слюну

собирали пассивным слюноотделением в отсутствие жевательных движений в стерильные пластиковые контейнеры емкостью 10 мл. От каждого участника было получено от 3 до 5-6 мл ротовой жидкости. Чтобы образец соответствовал критериям исследования, он не должен был иметь признаков присутствия крови. Сразу после сбора образцы слюны (ротовой жидкости) центрифугировали (скорость 8000 об/мин, время 15 мин), для удаления нежелательных частиц, затем супернатант собирали и разделяли на аликвоты. Часть аликвот каждого образца хранили при температуре от 2 до 8 градусов °C в течение 2-4 часов для последующего производства биохимических и генетических исследований *ex tempore*.

Для генетического тестирования образцов биоматериала применяли набор реагентов «ОнкоГенетика», использующих эффект флуоресценции, производства ООО «НПО ДНК-Технология» (Россия) для выделения ДНК из периферической крови и выявления наследственных мутаций 185delAG, 2080delA, 4153delA, 5382insC, с.3700 _ 3704delGTAAA, с.3756 _ 3759delGTCT, 300T>G (Cys61Gly), в гене человека BRCA1 и 6174delT в гене человека BRCA2 методом ПЦР в режиме реального времени. Подготовку к ПЦР проводили с использованием ПЦР-боксов. Применяли амплификатор детектирующий «ДТ лайт» производства ООО «НПО ДНК-Технология» (Россия), совмещающего функции прецизионного программируемого термоциклера и оптической системы, позволяющей регистрировать флуоресценцию реакционной смеси непосредственно в ходе ПЦР и осуществлялась автоматически с помощью программного обеспечения Real Time _ PCR v.7.3, поставляемого с детектирующим амплификатором.

Результаты исследования и их обсуждение

Существующие программы скрининга РМЖ кажутся недостаточным инструментом для женщин с высоким генетическим риском рака молочной железы. Одним из современных методов обследования при подозрении на РМЖ является выполнение генетического исследования на наличие мутаций, увеличивающих риски развития заболевания. Генетическое тестирование может значительно улучшить качество программ профилактики РМЖ, помочь выявить лиц из группы высокого риска, которым требуется интенсивное наблюдение, и женщин из группы низкого риска, которым следует избегать ненужных рентгеновских исследований и длительных интервалов между скрининговыми исследованиями до последующего контроля [7]. По имеющимся данным, мутации в генах BRCA1 или BRCA2 повышают риски развития РМЖ до 60-70% [8]. Обнаружить мутирующие гены можно с помощью специального генетического тестирования. Утверждают, что генетическое тестирование может обеспечить подходящий способ максимизировать безопасность и минимизировать вред при скрининге РМЖ и потенциально может улучшить программу и, следовательно, индивидуализировать раннее выявление и скрининг РМЖ.

Оценка генетических рисков также требуется здоровым пациенткам, имеющих близких родственниц у которых диагностирован РМЖ или рак яичников, имеют родственников любого пола с обнаруженными изменениями в генах BRCA1 или BRCA2 либо имеют доброкачественную опухоль молочной железы с признаками усиленного роста.

Важным элементом любой программы генетических исследований является сбор биологических образцов для получения ДНК. На сегодняшний день при генетическом тестировании преимущественное предпочтение отдается анализам крови, которые являются наиболее используемым биоматериалом для получения ДНК высокого качества, необходимой для анализа генов, ассоциированных с предрасположенностью к РМЖ. Для взятия образцов крови требуется квалифицированный специалист, а связанные с процедурой боль, стресс и беспокойство могут вызывать дискомфорт у обследуемых лиц. Это особенно проблематично в случае генетических тестов для прогнозирования риска, таких как тестирование BRCA, когда тестируемый человек часто совершенно здоров. Необходимость сдачи крови в таких случаях может демотивировать некоторых потенциальных пациентов от согласия на прохождение тестирования. Сбор крови может быть проблемой, особенно для новорожденных или людей с отклонениями в развитии или поведении. В этой связи существующие технологии генетического тестирования предрасположенностью к РМЖ все большую роль отводят неинвазивным методам получения биоматериала для генетического тестирования [9].

Сбор образцов с использованием слюны является простым методом получения ДНК зародышевой линии. Геномная ДНК может быть извлечена из слюны, которую проще получить самостоятельно. В отличие от сбора крови, для сбора слюны не требуется обученный флеботомист. Этот метод сбора ДНК становится все более популярным за последние годы благодаря простоте сбора и улучшению качества и количества ДНК, которую можно собрать из слюны [10]. Простой, дешевый и неинвазивный онкологический скрининг молочной железы является ключом к реальной эффективности ранней диагностики РМЖ. Таким образом, слюна и биомаркеры на ее основе имеют большой потенциал для клинического применения [11].

Результаты ряда исследований постулируют, что из-за простоты сбора, удобного хранения образцов, использование образцов слюны является хорошей альтернативой образцам крови для получения геномной ДНК высокого качества. Слюну считают надежным источником ДНК для самых разных генетических исследований [4, 12]. Установлено, что качество геномной ДНК из образцов слюны было сопоставимо с образцами крови по показателям чистоты, генотипирования и ПЦР – амплификации [13]. Показана пригодности ДНК, выделенной из слюны, для высокопроизводительного молекулярного генотипирования

путем сравнения ее эффективности с ДНК, выделенной из крови [14]. Полученные результаты позволили констатировать, что ДНК из крови и слюны показала частоту генотипирования и частоту воспроизводимости > 99% и послужили основанием для вывода, что слюна является источником ДНК достаточного количества и качества для целей генетических исследований. Слюну можно считать эквивалентным крови материалом для генетического анализа как для полногеномного секвенирования, так и для секвенирования всего человеческого экзома [15] и таким образом ДНК слюны становится все более важным инструментом для обнаружения геномных вариаций. Сообщается, что точность генотипирования ДНК, полученной из слюны, сравнима с точностью генотипирования ДНК, полученной из крови. Более 95% SNV, выявленных в слюне, соответствовали SNV, выявленным в крови по всему геному, во всех областях кодирования генов [16,12]. Молекулярное тестирование для всех наборов парных образцов ДНК крови-слюны от одних и тех же лиц продемонстрировало уровень совпадения результатов генотипирования 99,996 % [12].

Сравнение ДНК, выделенной из образцов крови и ДНК из слюны с точки зрения обнаружения мутаций зародышевой линии десяти разных людей с известными мутациями в локусах BRCA1 продемонстрировало наличие идентичных мутаций BRCA1 в ДНК из слюны и крови в 100% наблюдений. По результатам проведенного скринингового исследования слюны у 30 % обследованных лиц с семейным анамнезом заболевания, но без клинических признаков РМЖ, выявлены ассоциированные с опухолью мутации в гене BRCA1. Последующее исследование венозной крови лиц, у которых были обнаружены мутации в гене BRCA1 по данным генетического тестирования слюны, во всех анализируемых случаях подтвердило наличие идентичных мутаций в гене BRCA1 в образцах крови.

Заключение

Настоящее предварительное исследование не позволяет дать статистически значимую оценку результатов генетического тестирования слюны (ротовой жидкости) для скрининга РМЖ. Очевидно, это определяется недостаточным количеством проанализированных образцов биожидкостей. В то же время результаты данного исследования позволяют заключить, что зафиксированные результаты генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов слюны и крови могут рассматриваться, как аргументы, свидетельствующие о целесообразности генетических исследований для раннего выявления и скрининга РМЖ. Результаты данного исследования свидетельствуют, что скрининговое исследование слюны может предоставить информацию о наличии у близких родственников пациентов, с диагностированным РМЖ, мутаций в генах, ассоциированных с предрасположенностью к РМЖ, что важно для раннего выявления и оценки молекулярной гетерогенности заболевания. Сочетание генетического тестирования слюны и крови возможно станет основой разработки

эффективных тактик скрининговых и ранних диагностических исследований. Необходимы дополнительные исследования для расширенного непредвзятого анализа возможности использования тестирования слюны для обнаружения мутаций в гене BRCA1 с целью совершенствования скрининга РМЖ в сочетании с другими общепринятыми методами в составе комбинации ряда диагностических биомаркеров.

Список литературы

1. Giaquinto A.N., Sung H., Miller K.D., Kramer J.L., Newman L.A., Minihan A., Jemal A., Siegel R.L. Breast Cancer Statistics, 2022 // *CA Cancer J. Clin.* 2022. Vol. 72. Is. 6. P. 524-541. DOI: 10.3322/caac.21754.
2. Sarhangi N., Hajjari S., Heydari S.F., Ganjizadeh M., Rouhollah F., Hasanzad M. Breast cancer in the era of precision medicine // *Mol. Biol. Rep.* 2022. Vol. 49. Is. 10. P. 10023-10037. DOI: 10.1007/s11033-022-07571-2.
3. Мерабишвили В.М., Семиглазов В.Ф., Комяхов А.В., Семиглазова Т.Ю., Криворотько П.В., Беляев А.М. Состояние онкологической помощи в России: рак молочной железы. Эпидемиология и выживаемость больных. Влияние эпидемии бета-варианта коронавируса SARS-CoV-2 (клинико-популяционное исследование) // *Опухоли женской репродуктивной системы.* 2023. Т. 19(3). С.16-24. DOI: 10.17650/1994-4098-2023-19-3-16-24.
4. Pöchls U.G., Hack C.C., Ekici A.B., Beckmann M.W., Fasching P.A., Ruebner M., Huebner H. Saliva samples as a source of DNA for high throughput genotyping: an acceptable and sufficient means in improvement of risk estimation throughout mammographic diagnostics // *Eur. J. Med. Res.* 2018. Vol. 23. Is.1. P. 20. DOI: 10.1186/s40001-018-0318-9.
5. Mehrgou A., Akouchekian M. The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development // *Med. J. Islam. Repub. Iran.* 2016. Vol. 30. P. 369.
6. Chen Z., Wang X., Li X., Zhou Y., Chen K. Deep exploration of PARP inhibitors in breast cancer: monotherapy and combination therapy // *J. Int. Med. Res.* 2021. Vol. 49. Is. 2. P. 300060521991019. DOI: 10.1177/0300060521991019.
7. Horsman D., Wilson B.J., Avard D., Meschino W.S., Kim Sing C., Plante M., Eisen A., Howley H.E., Simard J. National Hereditary Cancer Task Force. Clinical management recommendations for surveillance and risk-reduction strategies for hereditary breast and ovarian cancer among individuals carrying a deleterious BRCA1 or BRCA2 mutation // *J. Obstet. Gynaecol. Can.* 2007. Vol. 29. Is. 1. P. 45-60. DOI: 10.1016/s1701-2163(16)32349-0.
8. DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics, 2013 // *CA Cancer J. Clin.* 2014. Vol. 64. Is. 1. P. 52-62. DOI: 10.3322/caac.21203.

9. Adámková V., Velemínský M., Zimmelová P., Hubáček J.A. Volunteer's willingness to genetic testing - lack of the understanding of the matter // *Physiol Res.* 2009. Vol. 58. Is. 1. P. S53-S54. DOI: 10.33549/physiolres.931854.
10. Garbieri T.F., Brozoski D.T., Dionísio T.J., Santos C.F., Neves L.T. Human DNA extraction from whole saliva that was fresh or stored for 3, 6 or 12 months using five different protocols // *J. Appl. Oral. Sci.* 2017. Vol. 25. Is. 2. P. 147-158. DOI: 10.1590/1678-77572016-0046.
11. Nonaka T., Wong D.T.W. Saliva Diagnostics // *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif)*. 2022. Vol. 15. Is.1. P. 107-121. DOI: 10.1146/annurev-anchem-061020-123959.
12. Gudiseva H.V., Hansen M., Gutierrez L., Collins D.W., He J., Verkuil L.D., Danford I.D., Sagaser A., Bowman A.S., Salowe R., Sankar P.S., Miller-Ellis E., Lehman A., O'Brien J.M. Saliva DNA quality and genotyping efficiency in a predominantly elderly population // *BMC Med Genomics.* 2016. Vol. 9. P. 17. DOI: 10.1186/s12920-016-0172-y.
13. Hansen T.V., Simonsen M.K., Nielsen F.C., Hundrup Y.A. Collection of blood, saliva, and buccal cell samples in a pilot study on the Danish nurse cohort: comparison of the response rate and quality of genomic DNA // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007. Vol. 16. Is. 10. P. 2072-2076. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0611.
14. Bruinsma F.J., Joo J.E., Wong E.M., Giles G.G., Southey M.C. The utility of DNA extracted from saliva for genome-wide molecular research platforms // *BMC Res Notes.* 2018. Vol. 11. Is. 1. P. 8. DOI: 10.1186/s13104-017-3110-y.
15. Kvapilova K., Misenko P., Radvanszky J., Brzon O., Budis J., Gazdarica J., Pos O., Korabecna M., Kasny M., Szemes T., Kvapil P., Paces J., Kozmik Z. Validated WGS and WES protocols proved saliva-derived gDNA as an equivalent to blood-derived gDNA for clinical and population genomic analyses // *BMC Genomics.* 2024. Vol. 25. Is. 1. P.187. DOI: 10.1186/s12864-024-10080-0.
16. Yao R.A., Akinrinade O., Chaix M., Mital S. Quality of whole genome sequencing from blood versus saliva derived DNA in cardiac patients // *BMC Med Genomics.* 2020. Vol. 13. Is. 1. P. 11. DOI: 10.1186/s12920-020-0664-7.