

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Шатохина Алина Станиславовна

**ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БИОХИМИЧЕСКИХ
И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ
И РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

1.5.4. Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Быков Илья Михайлович

Краснодар – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	13
1.1 Протеомы и транскриптомы крови и слюны человека в норме и при онкозаболеваниях	13
1.2 Биомаркеры в скрининге, диагностике и мониторинге рака молочной железы	20
1.2.1 Биомаркеры рака молочной железы в крови	22
1.2.2 Биомаркеры рака молочной железы в ротовой жидкости	29
1.3 Взаимосвязь между содержанием онкомаркеров рака молочной железы в крови и ротовой жидкости	36
1.4 Маркеры окислительного стресса в сыворотке крови и ротовой жидкости у пациентов с раком молочной железы	38
1.5 Генетические маркеры риска рака молочной железы	43
1.6 Паратгормон-родственный протеин, как потенциальный биомаркер рака молочной железы	47
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	51
2.1 Общая характеристика участников исследования	51
2.2 Материалы исследования	53
2.2.1 Сбор крови	54
2.2.2 Сбор образцов ротовой жидкости	54
2.3 Биохимические исследования крови и ротовой жидкости	56
2.4 Методы биохимической идентификации специфических онкомаркеров	56
2.4.1 Измерение содержания раково-эмбрионального антигена в сыворотке крови и ротовой жидкости	56

2.4.2 Измерение содержания ракового антигена СА15-3 в сыворотке крови и ротовой жидкости	57
2.5 Генетические исследования крови и ротовой жидкости	58
2.6 Исследование показателей прооксидантно-антиоксидантной системы крови и ротовой жидкости	59
2.6.1 Определение общей антиоксидантной активности	59
2.6.2 Определение концентрации тиолсодержащих соединений	61
2.6.3 Определение продуктов перекисной модификации	62
2.6.4 Определение активности ферментов антиоксидантной системы	63
2.7 Исследование содержания в плазме крови и в ротовой жидкости паратгормон-родственного протеина	65
2.8 Статистические методы исследования	66

ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЙ КАРТИНЫ И ИЗМЕНЕНИЙ ОНКОМАРКЕРОВ В КРОВИ И РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	67
3.1 Изменения лабораторных биохимических показателей в крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы	67
3.2 Изменения онкомаркеров в крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы	74
3.3 Молекулярно-генетические и биохимические исследования родственников больных раком молочной железы	77
3.4 Анализ диагностической ценности биомаркеров у больных раком молочной железы и их родственников	81

ГЛАВА 4. ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ БАЛАНСА ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ И РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	83
4.1 Изменения маркеров окислительного стресса в крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы	83

4.2	Изменения функционального состояния эндогенной системы антиоксидантной защиты в крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы	87
4.3	Анализ влияния биохимического профиля больных раком молочной железы на 2-х летнюю выживаемость	96
ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ		100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		110
	Выводы	116
	Практические рекомендации	118
	Перспективы дальнейшей разработки темы	119
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ		121
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		124
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА		146
ПРИЛОЖЕНИЕ. АКТЫ ВНЕДРЕНИЯ		149

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В структуре онкологических заболеваний значительная часть представлена злокачественными опухолями молочной железы. В 2021 году рак молочной железы (РМЖ) стал наиболее часто диагностируемым злокачественным новообразованием у женщин во всем мире и основной причиной смерти от рака среди женщин [57, 192]. Заболеваемость РМЖ быстро растет в развитых странах [186]. За последние годы отмечен неуклонный рост РМЖ в России, который является одним из самых частых онкологических заболеваний, диагностируемых у женщин [6, 12]. РМЖ представляет собой группу неопластических заболеваний, для которых характерна высокая внутриопухолевая и межопухолевая гетерогенность [48]. В последние годы наблюдается рост знаний о раке, сопровождаемый развитием подходов, позволяющих реализовать персонифицированные терапевтические стратегии. Заболеваемость и смертность от РМЖ можно снизить, если население имеет доступ к ранней диагностике и эффективному лечению. Раннее выявление и диагностика в сочетании с эффективным лечением РМЖ является решающим фактором в улучшении выживаемости пациентов и не только улучшает терапевтические результаты, но и положительно влияет на психологические, экономические и социальные осложнения этого заболевания [51]. Современным трендом в диагностике РМЖ является разработка неинвазивных/малоинвазивных диагностических процедур. Чувствительный анализ, который легко и точно идентифицирует биомаркеры с использованием неинвазивно собранных клинических образцов, в том числе ротовой жидкости, оптимален для выявления и скрининга РМЖ.

Степень разработанности темы

Слюна или ротовая жидкость, содержащая большое количество биохимических и генетических биомаркеров, в сочетании с простотой сбора считается многообещающим биологическим материалом для раннего выявления

заболеваний [172]. Сообщается о широком спектре слюнных биомаркеров для выявления РМЖ [173]. Bel'skaya L.V. et al., (2022) проанализировали более 30 биохимических показателей слюны при РМЖ и оценили их потенциальную значимость [132]. Это исследование было одним из крупнейших и включало пациентов с ранними стадиями РМЖ. У пациентов с РМЖ зафиксировано снижение содержания общего белка в слюне ($-40,7\%$) с одновременным повышением уровня α -аминокислот. Отмечено увеличение активности метаболических ферментов ЛДГ, ЩФ, ГГТ и α -амилазы. На фоне снижения активности каталазы и содержания мочевой кислоты увеличилась доля токсичных продуктов перекисного окисления липидов и МДА. Assad, D.X. et al. (2020) проанализировали концентрации СА15-3 в слюне и крови у пациенток с РМЖ с целью оценки новых диагностических подходов путем исследования СА15-3 в слюне [176]. Результаты показали, что определение СА15-3 подтверждает присутствие данного онкомаркера в слюне и этот факт может быть полезен для будущих исследований [71]. Важность таких исследований устанавливает базовую основу и осуществимость саливадиагностики рака, а также устанавливает основу для продолжения исследований биомаркеров. Безусловно, не следует ожидать, что тесты на онкомаркеры на основе крови или слюны заменят стандартный скрининговый физический осмотр и маммографию. Тем не менее, можно полагать, что использование новых биохимических тестов потенциально может повысить способность обнаруживать РМЖ на ранней стадии, когда он все еще излечим с помощью существующих методов лечения.

Цель исследования – определить диагностическую ценность онкомаркеров и биомаркеров окислительного стресса в крови и ротовой жидкости при раке молочной железы в их взаимосвязи с генетическими изменениями, характерными для этой патологии.

Задачи исследования:

1. Исследовать взаимосвязь биохимических показателей сыворотки крови и ротовой жидкости у больных раком молочной железы, рассматриваемых в качестве маркеров заболевания, а также охарактеризовать содержание и корреляционную взаимосвязь сывороточного и слюнного паратгормон-родственного протеина в

сравнении с данными контрольной группы в контексте потенциальной возможности его использования для диагностики рака молочной железы.

2. Исследовать состояние прооксидантно-антиоксидантной системы крови и ротовой жидкости для определения особенностей изменений показателей окислительного гомеостаза у пациенток с раком молочной железы.

3. Исследовать наличие генетических мутаций генов BRCA1 и BRCA2 методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и проанализировать их взаимосвязь с особенностями изменений показателей окислительного гомеостаза у пациенток с раком молочной железы.

4. Определить корреляционные связи изученных биохимических показателей крови и ротовой жидкости и данных исследований генетических мутаций BRCA1 и BRCA2 в тех же биологических жидкостях с целью установления возможных новых лабораторных диагностических подходов при данной патологии.

5. Предложить алгоритм прогнозирования и лабораторной диагностики рака молочной железы на основании оценки корреляционной взаимосвязи профиля онкомаркеров, биохимических показателей окислительного гомеостаза и наличия генетически ассоциированных признаков исследуемой онкопатологии.

Научная новизна исследования

В исследовании впервые:

1. Изучены особенности диагностической значимости взаимосвязи биохимических онкомаркеров, в том числе паратгормон-родственного протеина в крови и ротовой жидкости при раке молочной железы.

2. Изучены особенности взаимосвязи онкомаркеров и генетических предикторов рака молочной железы в крови и ротовой жидкости.

3. Исследовано состояние баланса прооксидантно-антиоксидантной системы крови и ротовой жидкости при раке молочной железы и их взаимосвязь с наличием у пациенток генетических мутаций BRCA1 и BRCA2.

4. На основании анализа прямых маркеров окислительного стресса и наличия генетических мутаций предложен коэффициент, позволяющий прогнозировать 2-летнюю выживаемость больных раком молочной железы.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретическая значимость работы заключается в выявлении особенностей биохимических изменений при раке молочной железы и взаимосвязи ряда диагностических показателей крови и ротовой жидкости. Практическая значимость работы заключается в выявлении состояния ряда биохимических показателей крови и слюны в их взаимосвязи с генетическими мутациями при раке молочной железы, которые позволяют обосновать дополнение стандартного перечня лабораторных исследований при данной патологии и внедрение в клинико-лабораторную практику разрабатываемого алгоритма диагностических исследований путем применения биохимического анализа состава ротовой жидкости. Это позволит повысить эффективность раннего выявления рака молочной железы и качество ведения больных с этим заболеванием.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа имеет очевидную практическую направленность на получение научно обоснованных результатов, обобщение которых позволяет достигнуть цели и решить поставленные задачи. В качестве методологической основы данного исследования применен системный метод научного познания, отвечающий принципам комплексности, целостности, объективности, достоверности. Методология динамического, проспективного исследования, основанного на первичной информации, включала следующие зоны приложения: постановка проблемы (оценка взаимосвязи биохимических характеристик крови и ротовой жидкости у пациентов с РМЖ); интерпретация полученных результатов, характеризующая законченность и цельность исследования, с формированием новых подходов решения изучаемой проблемы.

Следуя дизайну работы, последовательно использовалась совокупность методов научного познания: общелогические, лабораторные, анализ литературных источников. Работа выполнена с использованием современных биохимических, молекулярно-генетических, клинических и иммунохимических методов, сбор и обработка полученных результатов проводился с использованием адекватных статистических методов. Все разделы проведенного исследования выполнены в соответствии с правилами и принципами доказательной медицины.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Повышение информативности лабораторного скрининга, мониторинга и прогнозирования рака молочной железы возможно путем использования конstellации биохимических показателей одновременного тестирования в крови и ротовой жидкости в рамках комбинированной диагностической панели, включающей как общеизвестные лабораторно-диагностические критерии РМЖ, так и новые эндогенные молекулярные паттерны, обладающие потенциальными возможностями рационального усовершенствования диагностических подходов при данной патологии.

2. Выявление мутации в гене BRCA1 в качестве маркеров генетических признаков, ассоциированных с РМЖ, в 100% случаев продемонстрировало совпадение результатов исследования периферической венозной крови и ротовой жидкости, что может стать предпосылкой для разработки эффективных тактик скрининговых и ранних диагностических исследований, включающих сочетание параллельных исследований слюны и крови.

3. Исследование биохимических показателей крови и слюны в их взаимосвязи с генетическими мутациями при раке молочной железы, позволяет обосновать дополнение стандартного перечня лабораторных исследований при данной патологии и внедрение в клинко-лабораторную практику разработанного алгоритма диагностики заболевания путем применения сочетанного биохимического анализа состава ротовой жидкости и периферической крови.

4. Перспективным онкомаркером при раке молочной железы является паратгормон-родственный протеин, концентрация которого статистически значимо увеличена у больных с впервые выявленным заболеванием не только в периферической крови, но и в ротовой жидкости.

Степень достоверности и апробации работы

Исследования выполнены на базе лаборатории кафедры фундаментальной и клинической биохимии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения

Российской Федерации (ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России) и клинико-диагностической лаборатории государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Клинический онкологический диспансер № 1» министерства здравоохранения Краснодарского края (ГБУЗ КОД № 1 МЗ КК) оснащенными всем необходимым современным оборудованием. Все научные положения, выводы и практические рекомендации, представленные в диссертационном исследовании, получены на основании анализа большого клинического материала с применением адекватных методов статистического анализа с помощью компьютерных программ AnalystSoft Inc., StatPlus – программа статистического анализа, версия 7., что обеспечило обоснованность и достоверность результатов работы. Обработку данных проводили с учетом проверки нормальности распределения выборок и использования непараметрических критериев.

Диссертационное исследование выполнено в рамках комплексной темы научно-исследовательской работы кафедры фундаментальной и клинической биохимии: № 121110900082-3 (2021–2026 гг.) «Исследование молекулярных механизмов патологических процессов в условиях коморбидных форм социально значимых заболеваний» в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Основные результаты выполненной диссертационной работы доложены и обсуждены на XII Съезде онкологов России (Самара, 2023 г.), IX Ежегодном конгрессе Российского общества специалистов по опухолям головы и шеи с международным участием (Москва, 2023 г.), VII международном форуме онкологии и радиотерапии (Москва, 2024), Форуме Онкологов ЮФО 2025 (Сочи, 2025 г.), II междисциплинарной научно-практической конференции «Организация оказания помощи онкологическим пациентам» (Краснодар, 2025 г.), VI международном форуме «Инновационная онкология 2025» (Москва, 2025 г.).

Соответствие диссертации научной специальности

Основные научные положения диссертации соответствуют п. 11 «Биохимические/метаболические/энергетические процессы в тканях и органах организма в норме и при патологии. Функциональная и клиническая

метаболизма в норме и при патологии», п. 13 «Клиническая биохимия человека и животных» паспорта специальности 1.5.4. Биохимия.

Внедрение результатов исследования

Основные результаты диссертационного исследования, сформулированные в качестве практических рекомендаций, внедрены в лабораторную практику ГБУЗ «КОД №1» МЗ КК. Ключевые теоретические положения, сформулированные в результате выполнения диссертации, внедрены в учебный процесс кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России и используются для чтения лекционного материала и проведения практических занятий по дисциплине «Клиническая биохимия». Система рекомендаций по разработке алгоритмов лабораторного прогнозирования исходов онкологических заболеваний внедрена и используется в центральной научно-исследовательской лаборатории и научно-технологическом центре биомедицины ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (приложение А).

Личный вклад автора

Диссертантом разработан дизайн исследования (87 %), выполнен информационный поиск, включающий анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационной работы (91 %), самостоятельно выполнены все экспериментальные и лабораторные исследования, проведена статистическая обработка данных (86 %). Соискателем сформулированы выводы, положения, выносимые на защиту, предложения для внедрения и практические рекомендации (89 %). Диссертант принимал непосредственное участие в написании статей (73 %) и тезисов (80 %), подготовил текст, таблицы и рисунки для диссертации (96 %).

Публикации по теме диссертации

Всего по материалам диссертационной работы опубликовано 12 научных работ, из которых 3 – в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук и издания, приравненные к ним.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация изложена на 152 страницах машинописного текста и состоит из введения, пяти глав, заключения и списка литературы, иллюстрирована 14 таблицами и 13 рисунками. Указатель литературы содержит 213 источников, из которых 17 отечественных и 196 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В данной главе проанализированы существующие представления о биохимических показателях крови и ротовой жидкости при раке молочной железы и их диагностической значимости. Исторически кровь была основной диагностической жидкостью организма для анализа изменений концентрации различных аналитов как индикаторов патофизиологического состояния. Тем не менее, благодаря неинвазивному и простому методу сбора, слюна получает все большее признание в качестве жидкости организма, которую можно использовать для идентификации белковых маркеров ряда заболеваний, как локальных, так и системных, включая РМЖ.

1.1 Протеомы и транскриптомы крови и слюны человека в норме и при онкозаболеваниях

Стратегическая идентификация заболеваний на основе протеомики рассматривается как один из динамичных и инновационных инструментов, которые могут подтверждать, дополнять или нередко предоставлять более подробную информацию, помимо той, которая получается с помощью других высокопроизводительных подходов, таких как геномика, транскриптомика и эпигеномика. Углубленное изучение протеомных профилей различных биологических образцов, полученных от больных раком, расширяет понимание патогенеза опухолей, мониторинга и выявления новых мишеней для терапии рака. Белки могут активно секретироваться или высвобождаться опухолевыми клетками в результате некроза или апоптоза и высвобождаться в кровообращение [127]. Это меняет профиль белка. Протеом слюны представляет собой сложную

белковую смесь, образующуюся в результате деятельности слюнных желез и сыворотки, клеток слизистой оболочки и/или иммунных клеток или микроорганизмов, муцины, сывороточный альбумин человека, лизоцим, IgA и IgG, лактоферрин, богатые пролином белки, гистатины, кателицидины, дефенсины, гликопротеины, липопротеины, статерин и матриксные металлопротеазы [91, 161]. На основе недавней экспериментальной работы был составлен каталог из 2 290 белков, обнаруженных в цельной слюне. Этот список белков слюны сравнивают с 2 698 белками, обнаруженными в плазме. Приблизительно 27 % белков всей слюны обнаружены также и в плазме, что указывает на то, что многие компоненты слюны происходят из крови [41, 193]. Однако, несмотря на эту кажущуюся низкую степень совпадения, распределение, обнаруженное в категориях генной онтологии, таких как молекулярная функция, биологические процессы и клеточные компоненты, демонстрирует значительное сходство. Различия в составе и функциях белков можно увидеть при сравнении протеомов слюны и плазмы. В плазме/сыворотке человека преобладают иммуноглобулины и альбумины, составляющие 60–80 % от общей массы. Наиболее распространенные 22 белка в плазме составляют 99 % от общего содержания белка в плазме. Однако для цельной слюны 20 самых распространенных белков составляют лишь приблизительно 40 % содержания белка в слюне [66]. Некоторые из наиболее распространенных белков плазмы обнаруживаются в слюне в диапазоне от умеренного до высокого, но было обнаружено, что только несколько белков с высоким содержанием в слюне имеют такое же высокое относительное содержание в плазме. Эта ситуация значительно упрощает задачу использования слюнных жидкостей для обнаружения потенциальных онкомаркеров. Более того, почти 40 % белков, которые предположительно могут быть маркерами таких заболеваний, как рак, сердечно-сосудистые заболевания и инсульт, можно найти в цельной слюне. Около 30 % белков крови также присутствуют в слюне, что подчеркивает значение ее использования в клинико-диагностических целях. Значительное совпадение содержания белка в слюне и плазме может свидетельствовать о том, что слюна

может быть использована в качестве диагностической альтернативы анализам крови. Показано, что существует высокая корреляция между количеством перекрывающихся иммуноглобулинов в слюне и плазме, что позволяет предположить, что эти иммуноглобулины слюны могут быть результатом их поступления из плазмы. Точные механизмы транспорта определенных белков плазмы в слюнную систему неизвестны [193]. Это наблюдение может иметь соответствующие клинические диагностические последствия, поскольку имело место значительная линейность распределения иммуноглобулинов между компартментами плазмы и слюны, предполагая, что любое антитело, включая аутоантитело, можно было бы обнаружить в плазме и слюне, при этом концентрация в слюне является отражающей и линейной по отношению к концентрации в плазме. Это предполагает, что аутоантитела с диагностической ценностью в крови, вероятно, могут быть обнаружены и могут иметь диагностическое значение при мониторинге в слюне.

Однако, несмотря на кажущееся малое перекрытие белков, идентифицированных в протеомах слюны и плазмы (только 616 белков, или 14 %, являются общими среди 4 372 уникальных белков в двух объединенных протеомах), распределения их генных онтологий поразительно схожи. Это, возможно, предполагает потенциальную клиническую роль ротовой жидкости для скрининга здоровья и выявления заболеваний. Предполагается, что биомаркеры крови могут быть обнаружены в слюне, что имеет большее значение в отношении диагностического потенциала слюны. Приблизительно 73 % белков слюны не присутствуют в плазме, что дает уникальные возможности для обнаружения и использования слюнных протеомных маркеров, которые уникально присутствуют в слюне. Успешная валидация этих биомаркеров заболеваний, специфичных для слюны, станет самым убедительным обоснованием использования слюны для трансляционных и клинических применений при неоральных системных заболеваниях. Из 1 058 белков, заявленных как потенциальные биомаркеры рака [27], 34 % обнаружены в протеоме слюны, а 12 % обнаружены как в протеомах слюны, так и в плазме.

Подобные исследования должны открыть новые возможности для использования протеома слюны в качестве основы для новых неинвазивных тестов для скрининга, обнаружения и мониторинга заболеваний. Доктор Лоуренс Табак, директор Национального института стоматологии и черепно-лицевых исследований Национального института здравоохранения (США) допускает, что выяснение компонентов слюнной жидкости «может однажды привести к появлению миниатюрных лабораторий на чипе, используемых для наблюдения за здоровьем человека и обнаружения изменений, которые могут сигнализировать о начале болезни» [194]. Ученые давно признали, что слюна служит зеркалом здоровья, поскольку она содержит полный спектр белков, гормонов, антител и других аналитов, часто измеряемых в анализах крови. Завершение всеобъемлющего каталога всех белков, обнаруженных в слюне здоровых людей, поможет сделать слюну научно подтвержденной диагностической жидкостью для выявления ранних признаков заболевания во всем организме.

Исследования, посвященные анализу протеома и транскриптома слюны, показали большой потенциал этой биологической жидкости для выявления РМЖ [47, 160]. Транскриптом слюны – это новый диагностический алфавит, который использовали для обнаружения биомаркеров РМЖ. Слюна содержит различные типы транскриптов РНК, включая мРНК, взаимодействующую с пиРНК и микроРНК (миРНК) [60, 195]. Bahn J.H., et al. (2015) провели углубленный биоинформатический анализ некодирующих РНК (нкРНК) в бесклеточной слюне (CFS) здоровых людей, уделяя особое внимание микроРНК (миРНК), piwi-взаимодействующим РНК (пиРНК) и кольцевым РНК (цРНК). Используя индивидуальный метод биоинформатики, авторы идентифицировали > 400 цРНК в CFS. Это исследование предоставляет полную картину видов нкРНК в слюне человека, что будет способствовать дальнейшим открытиям биомаркеров в слюне человека [95, 195].

В ряде исследований обнаружено наличие мРНК в слюне и полезность их анализа для выявления РМЖ [210, 211]. Эти результаты не только предоставили исследователям новый источник биомаркеров, но и новый метод перекрестной

проверки протеомных результатов. Параллельно с этими исследованиями проводились исследования по оценке уровней микроРНК слюны как потенциальных биомаркеров РМЖ [133]. Было продемонстрировано, что профили микроРНК слюны изменяются вторично по отношению к РМЖ. Высокопроизводительное профилирование выявило значительные различия в профилях генных сигнатур между пациентами с РМЖ и контрольной группой, демонстрируя, что транскриптом слюны является источником информативных биомаркеров для системного обнаружения рака [45, 201].

Протеомный анализ слюны имеет явные преимущества перед анализом крови, особенно для белков с низким содержанием, благодаря более равномерному распределению отдельных пептидов слюны [66]. Использование транскриптомных и протеомных подходов для обнаружения и предварительной проверки биомаркеров в слюне для неинвазивного выявления РМЖ продемонстрировало значительные различия в транскриптомных и протеомных профилях слюны между пациентами с РМЖ и контрольной группой. Обнаруженные биомаркеры слюны обладают высокой специфичностью и чувствительностью к распознаванию РМЖ. Gilson Sena I.F. et al. (2022) провели исследование, направленное на выявление слюнных биомаркеров, присутствующих на начальных стадиях РМЖ, когда гистопатологический анализ еще не обнаруживает клеточных изменений [105]. Авторы использовали модель РМЖ на трансгенных мышах для выявления молекулярных изменений в предраковой стадии с помощью анализа белков в слюне и установили, что белки, связанные с метаболическими изменениями, воспалительным процессом и деградацией клеточного матрикса, обнаруживаются в слюне в начале развития опухоли. Эта работа продемонстрировала, что профили белков слюны можно использовать для выявления клеточных изменений, связанных с предклинической стадией РМЖ, с помощью неинвазивных средств, даже до выявления заболевания при биопсии.

Утверждается, что установить однозначную связь между биохимическими показателями, в том числе минеральным и белковым составом, активностью ферментов слюны и плазмы крови, сложно. Было показано наличие корреляции

между активностью лактатдегидрогеназы в слюне и плазме крови. Экспериментальные исследования показали, что мочевины слюны значительно и положительно коррелирует с мочевиной сыворотки [108]. Известно, что концентрация большинства электролитов и микроэлементов в слюне сопоставима с их концентрацией в сыворотке и плазме [142]. Однако многие органические компоненты содержатся в слюне в концентрациях значительно меньших, чем в плазме, в частности, концентрация альбумина в слюне составляет всего 0,1–1 % от его концентрации в плазме.

Известно, что изменения концентрации сывороточного белка связаны с раковыми заболеваниями и могут предоставить важную диагностическую информацию [67]. Установлено, что уровни белка в сыворотке могут претерпевать изменения во время развития и прогрессирования РМЖ [185]. Белки, секретируемые опухолями в качестве секрета рака, циркулирующие белки сыворотки или плазмы играют ключевую роль в развитии и прогрессировании РМЖ и представляют собой важный источник биомаркеров для определения риска рака. Белок плазмы крови ферритин является маркером пролиферирующей соединительной ткани. Его концентрация в крови значительно повышается при метастазированном РМЖ, особенно в случае поражения печени. При крайне неблагоприятной по прогнозу отечно-инфильтративной форме РМЖ уровень ферритина может превышать нормативные значения в 10 раз [16]. Более чем у 50 % всех больных РМЖ сывороточная концентрация лактоферрина превышала верхнюю границу нормативных значений. Известно, что в клетках опухоли ген лактоферрина не экспрессируется либо вообще отсутствует [166]. Высокий уровень этого маркера при РМЖ, вероятно, обусловлен реакцией организма на малигнизированную ткань. Al-Muhtaseb S.I. (2014) изучил изменения содержания общего белка в сыворотке и слюне женщин, больных РМЖ, и здоровых женщин. Результаты показали, что общий белок сыворотки крови был выше у женщин, больных РМЖ, тогда как уровни в слюне были ниже по сравнению со здоровой женской группой [22].

Jinno H. et al., (2015) провели комплексный анализ метаболитов образцов слюны, полученных от больных РМЖ и здоровых людей. Показано, что пять

потенциальных биомаркеров слюны продемонстрировали значительно более высокие концентрации у больных РМЖ по сравнению со здоровыми людьми. Авторы заключили, что метаболиты слюны являются многообещающими биомаркерами для ранней диагностики РМЖ [110]. Биопотонную технологию исследования слюны использовали Ferreira I.C.C. et al. (2020) для выявления биомаркеров РМЖ в качестве стратегии раннего выявления заболевания [32]. Инфракрасную спектроскопию с преобразованием Фурье (FTIR) применили для анализа компонентов слюны пациентов с РМЖ, доброкачественными заболеваниями молочной железы и контрольной группы здоровых людей, чтобы изучить ее потенциальное использование в диагностике РМЖ. FTIR может эффективно предоставлять информацию о всей биохимической характеристике (включая белки, липиды, нуклеиновые кислоты и углеводы) биологического образца, а не об одном конкретном белке в качестве биомаркера [80, 83]. ИК-Фурье-спектроскопия способна показать изменения, связанные с канцерогенезом, для нескольких видов рака человека [52] включая РМЖ [136], в основном для обнаружения заболевания [80]. Эти инновационные результаты показывают, что анализ слюны с помощью ИК-Фурье-спектроскопии является многообещающим инструментом для диагностики РМЖ.

Анализ прямой биопсии опухоли является, пожалуй, наиболее точным подходом молекулярной диагностики рака. Однако взятие образцов опухоли может быть крайне неудобным для пациента, а повторная биопсия для мониторинга заболевания не всегда возможна. Более того, некоторые глубоко расположенные опухоли могут оказаться непригодными для этого метода. Эти недостатки побудили поиск менее инвазивных методов диагностики и наблюдения за раком. Циркулирующая опухолевая ДНК (цДНК) обнаруживается в сыворотке и состоит из геномной ДНК, выделяющейся из исходной опухоли [79, 88]. Специфические для рака мутационные признаки цДНК можно отличить от таковых в ДНК из нераковых тканей. Показана высокая степень соответствия между мутационными профилями в цДНК и таковыми в первичной опухоли [74, 75]. Этот подход к жидкой биопсии на основе цДНК применяется во многих

доклинических и клинических условиях. Хотя большинство жидких биопсий берутся путем игольной аспирации крови, слюнная жидкость может стать еще менее инвазивным средством мониторинга заболевания [73, 170]. Стабильность и относительно высокое качество ДНК слюны делают эту возможность еще более привлекательной [43]. Недавнее исследование [138] показало, что комбинированный анализ ДНК плазмы и слюны дал уровень обнаружения 96 % , независимо от локализации или стадии опухоли.

1.2 Биомаркеры в скрининге, диагностике и мониторинге рака молочной железы

В литературе описано большое количество онкомаркеров, повышение которых в сыворотке ассоциировано с развитием опухолевого процесса различного генеза. Биологическая роль опухолевых маркеров недостаточно изучена, но полагают, что они участвуют в формировании злокачественного фенотипа опухолевых клеток. Опухолевые маркеры РМЖ включают ассоциированные с опухолью антигены или антитела к ним СА15-3, МСА, СА27.29, СА549; онкофетальные антигены РЭА, АФП; гормоны эстрадиол, пролактин; рецепторы эстрогенов и прогестерона; белки крови и тканевые белки ферритин, лактоферрин, цитокератины [15, 97, 204]. Несколько различных опухолеспецифических антигенов продуцируются опухолевыми клетками или клетками-хозяевами в ответ на онкогенез. Эти уникальные антигены могут использоваться для скрининга, диагностики и мониторинга рака в качестве онкомаркеров. Чувствительность и специфичность отдельного опухолевого маркера могут быть низкими, но комбинация нескольких опухолевых маркеров может быть очень полезной в качестве клинического инструмента в онкологии. Существует некоторая корреляция между опухолевыми маркерами и клинко-патологической характеристикой опухоли [165] и когда получение образцов

тканей невозможно, в некоторых случаях сывороточные маркеры могут дать полезную информацию о фенотипе РМЖ на ранней стадии [182]. Таким образом, белковые биомаркеры, дифференциально экспрессируемые в крови, могут быть использованы для разработки неинвазивных и опухолеспецифических тестов на основе крови для мониторинга РМЖ. Онкомаркеры считаются неинвазивным и экономически эффективным способом наблюдения за течением заболевания, определения прогноза и планирования лечения путем мониторинга ответа на лечение [203], однако их применимость для диагностики РМЖ является предметом дискуссии [135].

Поскольку целью данного литературного обзора является представление существующей информации о роли онкомаркёров РМЖ, выявляемых в крови и ротовой жидкости в скрининге, диагностике и прогнозировании пациенток с РМЖ, то большая часть данного обзора сфокусирована на наиболее часто используемые в мире маркёрах РМЖ таких как СА15-3, РЭА, СА125 и Her2/neu. Наибольший интерес представляют ассоциированные с опухолью антигены – онкомаркеры, синтезируемые непосредственно раковыми клетками. Базовым онкомаркером РМЖ является СА15-3, с ним принято проводить сравнение клинической значимости новых биохимических маркеров. Трансмембранный гликопротеин муцин 1, который также известен как раковый антиген 15-3 (СА15-3), сверхэкспрессируется при различных эпителиальных раках и играет решающую роль в прогрессировании заболевания. HER2 представляет собой трансмембранный гликопротеин рецептора тирозинкиназы из семейства эпидермальных факторов роста (EGF), который регулирует рост, выживание, дифференцировку и пролиферацию клеток [111]. HER2 сверхэкспрессирован у 15–20 % пациентов с РМЖ и является важным биомаркером неблагоприятного прогноза. Белок c-erbB-2, также известный как Her2/neu (human epidermal growth factor receptor-2), является прогностическим маркером РМЖ, определяемым в биоптатах тканей женщин, у которых диагностированы злокачественные опухоли.

1.2.1 Биомаркеры рака молочной железы в крови

Сывороточные опухолевые маркеры при раке молочной железы включают раковый антиген 15-3 (CA15-3), раковый антиген 27-29 (CA27-29), раковый эмбриональный антиген – РЭА (карциноэмбриональный антиген, СЕА), тканевый полипептидный антиген (ТРА), циркулирующий внеклеточный домен HER-2 и тканевый полипептид-специфический антиген (TPS). Среди них CA15-3 и РЭА являются наиболее часто используемыми и рекомендуемыми маркерами. Сывороточные опухолевые маркеры, такие как РЭА и CA15-3 или CA27-29, используются в современной клинической практике для оценки широко распространенного РМЖ или для выявления его рецидива и реже для выявления нового рака груди [20, 24] (таблица 1). Сывороточные маркеры могут быть легко получены, но их роль в диагностике РМЖ остается спорной [65].

Таблица 1 – Биомаркеры рака молочной железы, определяемые в периферической крови

Сывороточные онкомаркеры РМЖ	Источник информации
Раковый антиген CA15-3	71, 63, 98
HER2/neu, c-erbB2	2
РЭА (раково-эмбриональный антиген)	31, 187
Раковый антиген CA125	31, 119
Раковый антиген CA27-29 (MUC1)	155
МСА (муциноподобный рако-ассоциированный антиген)	137
Биомаркеры окислительного стресса. Продукты, нарушающие сывороточный окислительно – восстановительный статус	18, 30, 143
Сывороточные белки	153
Мутации генов BRCA1 и BRCA2	25, 99, 169

Многолетний опыт определения концентрации CA15-3 в клинической лабораторной практике свидетельствует о том, что данный онкомаркер

недостаточно эффективен для скрининга РМЖ у женщин, не имеющих симптомов, характерных для опухолевого заболевания. Чувствительность первичной диагностики РМЖ варьирует от 15 до 60 % (в среднем составляет около 30 %) [107]. В то же время данные количественного определения СА15-3 в сыворотке крови позволяют весьма надежно (со специфичностью 95 %) дифференцировать карциному от доброкачественных опухолей. Сфера применения результатов исследования СА15-3 включает в себя мониторинг течения заболевания, оценку эффективности проводимой терапии и диагностику рецидива РМЖ. Наиболее часто для обследования больных РМЖ используют совместный количественный анализ СА15-3 и РЭА в динамике [183]. Его результаты позволяют осуществлять раннюю диагностику метастазов в кости и печень у 60–80 % пациентов с РМЖ.

Была оценена диагностическая ценность сывороточных опухолевых маркеров РЭА, ракового антигена СА19-9, СА125, СА15-3 и тканевого специфического полипептида (TPS) при метастатическом РМЖ и выявлены статистические различия в концентрации и положительных показателях РЭА, СА19-9, СА125, СА15-3 и TPS между группой пациентов с метастатическим РМЖ и контрольной группой [31]. Самая высокая чувствительность была у РЭА, а самая высокая специфичность у СА125 для диагностики метастатического РМЖ при использовании одного онкомаркера – 56,7 % и 97,0 % соответственно. Кроме того, для диагностики метастатического РМЖ использовались два онкомаркера, и комбинация РЭА и ТПС имела самую высокую диагностическую чувствительность (78,7 %), тогда как комбинация СА15-3 и СА125 имела самую высокую специфичность 91,5 % . Li X. et al., (2018) проанализировали клинко-патологическое и прогностическое значение ракового антигена 15-3 и РЭА при РМЖ в рамках метаанализа, включающего 12 993 пациента. Результаты исследования позволили констатировать, что повышенный уровень СА15-3 или РЭА был статистически значимым при более низкой безрецидивной выживаемости при РМЖ. Анализ подгрупп показал, что СА15-3 или РЭА имели значительные прогностические значения для первичных или метастазирующих

типов. Оба эти повышенных маркера были связаны с более высокой опухолевой массой. Этот мета-анализ показал, что повышенный уровень СА15-3 или РЭА в сыворотке был связан с плохой безрецидивной и общей выживаемостью у пациентов с РМЖ, и их следует проверять чаще, если это возможно [65].

Зафиксирован достоверный рост уровня СА15-3 с прогрессированием заболевания и ухудшением прогноза его течения. Результаты, полученные в настоящем исследовании, подтверждаются литературными данными, где указывается, что снижение маркера СА15-3 более чем на 50 % от исходного уровня свидетельствует об относительно благоприятном прогнозе течения заболевания [4]. Zhao W. et al., (2021) изучили связи уровней РЭА, СА15-3 и СА125 в сыворотке с клинико-патологическими характеристиками РМЖ, чтобы найти прогностические маркеры заболевания [31]. В исследовании был проанализирован 961 пациент с РМЖ с предоперационными уровнями в сыворотке крови РЭА, СА15-3 и СА125 и определены корреляции уровней РЭА, СА15-3 и СА125 в сыворотке с молекулярными подтипами опухоли. Увеличение сывороточных концентраций РЭА, СА15-3 и СА125 было обнаружено у 4,99 % , 5,62 % и 5,72 % больных РМЖ соответственно. Однофакторный анализ показал, что уровни РЭА и СА15-3 достоверно связаны с молекулярными типами рака молочной железы. Статус Her-2 положительный имел достоверную связь с повышенным уровнем РЭА. Авторы констатировали, что РЭА и СА15-3 могут улучшить прогнозирование для пациентов с РМЖ.

Раковый эмбриональный антиген (РЭА) является важным сывороточным онкомаркером, играющим существенную роль в диагностике и мониторинге различных солидных опухолей. Около 36-70 % случаев РМЖ имеют повышенный уровень РЭА в сыворотке крови. Однако имеющиеся исследования показывают расхождения в оценке прогностического значения РЭА при распространенном РМЖ. Аноор Т.М. et al. (2022) оценили уровень РЭА в сыворотке у пациентов с метастатическим РМЖ в проспективном клиническом исследовании, а также изучили связь уровней РЭА в сыворотке с известными прогностическими факторами [187]. Повышенные уровни РЭА в сыворотке после лечения связаны с

прогрессированием заболевания и плохим ответом на терапию. Устойчиво повышенные уровни РЭА в сыворотке после лечения в значительной степени связаны с метастазами в кости. Повышенный уровень РЭА в сыворотке крови и гормональный статус являются важными предикторами ответа на лечение.

РЭА и СА15-3 тестируемые в образцах крови являются наиболее часто используемыми онкомаркерами при РМЖ и дополняют друг друга по своим диагностическим характеристикам. Ning J.X. et al. (2020) показали, что в то время как РЭА имеет более высокую чувствительность 75 %, СА15-3 имеет более высокую специфичность 97 % [63]. Комбинация двух тестов дала самые высокие характеристики диагностической точности. Поскольку оценка опухолевых маркеров является быстрой, относительно простой в выполнении и имеет высокие положительные прогностические значения, регулярное определение этих двух сывороточных опухолевых маркеров может помочь в раннем выявлении рецидивов заболевания. Прогностическое значение уровней предоперационного РЭА и СА15-3 при РМЖ является спорным. Ограничения в интерпретации постоянно повышенных опухолевых маркеров могут быть преодолены с помощью анализа скорости опухолевых маркеров. Ning J.X., et al., (2020) введя понятие скорости опухолевого маркера, которая представляет собой скорость изменения опухолевого маркера, провели анализ клинической полезности скорости изменения онкомаркера СА15-3 и РЭА при эпиднадзоре за РМЖ [63]. Были получены последовательные измерения онкомаркеров до и после рецидива заболевания. Измерения онкомаркеров проводились через регулярные промежутки времени с интервалом от 3 до 6 месяцев. Скорость маркера опухоли была получена из среднего изменения последовательных значений маркера опухоли с течением времени, выраженного в единицах/год. Основываясь на значениях индекса Юдена, оптимальные пороговые значения для скорости СА15-3 и скорости РЭА были получены и составили 2,5 ЕД/мл/год и 1,2 нг/мл/год соответственно. Когда скорость любого маркера опухоли превышала пороговые значения, чувствительность, специфичность, отрицательная прогностическая ценность и положительная прогностическая ценность составляли 94,0 %, 73,1 %, 94,0 %, 73,1 %, 94,0 %, 73,1 %, 94,0 %, 73,1 %.

92,5 % и 77,8 % соответственно. Результаты этого исследования выявили сильную связь между скоростью маркера опухоли и рецидивом РМЖ. Скорость онкомаркеров может быть полезным дополнением к абсолютным значениям онкомаркеров, чтобы отличить клинически значимые повышенные опухолевые маркеры от исходных отклонений. Это может помочь уточнить клиническую полезность серийных измерений СА15-3 и РЭА при наблюдении за РМЖ.

СА15-3 и РЭА являются двумя онкомаркерами, одобренными Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) для мониторинга РМЖ [26]. Fu Y., Li H. (2016) представили метаанализ ассоциативных исследований, изучающий связь между уровнями СА15-3 и РЭА в сыворотке крови и предрасположенностью к РМЖ [93]. Всего в этом анализе включено 1179 случаев РМЖ и 493 контрольных, которые показывают, что уровни СА15-3 и РЭА в сыворотке являются потенциальными биомаркерами для мониторинга РМЖ. В частности, обнаружены статистически значимые повышенные уровни СА15-3 и РЭА в сыворотке у пациенток со злокачественными опухолями молочной железы, но не у пациенток с доброкачественными опухолями. Метаанализ подгрупп для СА15-3 с точки зрения различных клинических стадий опухоли (стадия I, II и III) позволил констатировать, что уровень СА15-3 продолжает увеличиваться по мере прогрессирования РМЖ. Эти результаты свидетельствуют о том, что уровень СА15-3 может быть более эффективным для мониторинга распространенных опухолей, чем для ранней диагностики. В недавнем исследовании Hasan D. (2022) изучили эффективность мониторинга химиотерапии и прогностической чувствительности СА15-3 и РЭА на ранней (II) и поздней (IV) клинических стадиях больных РМЖ [98]. Автор наблюдал более высокое повышение СА15-3 по сравнению с РЭА в группе больных РМЖ до лечения по сравнению со здоровым контролем. Пациенты на поздней стадии показали более высокие положительные уровни в сыворотке по сравнению с ранней стадией для обоих маркеров с предпочтением СА15-3 над РЭА. Это позволило заключить, что СА15-3 более эффективен в качестве маркера прогностического мониторинга по

сравнению с РЭА и выявляет положительную связь между системой режимов химиотерапии и стадированием, более выраженную в поздних стадиях.

Раковый антиген СА27-29 представляет собой углеводсодержащий белковый антиген, который служит опухолевым маркером РМЖ. Его также называют антигеном, ассоциированным с карциномой молочной железы [155]. Он вырабатывается геном MUC-1. СА27-29 тесно связан с РМЖ, поскольку у 80 % женщин с РМЖ наблюдаются его повышенные уровни. СА27-29 имеет клиническую эффективность, аналогичную СА15-3 у пациентов с РМЖ. Фактические данные показали, что СА27-29 может быть более чувствительным, но менее специфичным маркером, чем СА15-3, и обычно считается, что они по существу эквивалентны для большинства клинических целей. Низкая чувствительность и отсутствие специфичности не позволяют использовать этот метод для скрининга рака молочной железы. Более полезно его исследование для выявления прогрессирования заболевания и метастатического поражения. СА27-29 кажется более чувствительным и специфичным, чем РЭА, но он действует аналогично СА15-3 для более раннего выявления метастатического заболевания во время последующего скрининга. Rack B. et al. (2016) показали, что существует тесная взаимосвязь между уровнями СА27.29 и массой опухоли [53].

Анализы СА15-3 и РЭА иногда комбинируют на практике с анализом СА125 при расширенной оценке РМЖ [119]. СА15-3 обычно используется для мониторинга терапии и прогнозирования рецидивов у пациентов с РМЖ. Показано, что сывороточные уровни РЭА, СА125 и СА15-3 имеют большое значение при лечении пациентов с РМЖ и могут служить в качестве прогностических показателей и для мониторинга течения заболевания [31]. Исследование было направлено на изучение роли сывороточных онкомаркеров РЭА, СА125 и СА15-3 в лечении РМЖ и их связи с клинико-патологическими параметрами пациентов, а также с различными молекулярными подтипами опухоли. Показано, что уровни РЭА, СА125 и СА15-3 в сыворотке были значительно выше у пациентов с РМЖ, чем у контрольной группы. Кроме того, у пациентов с раком на поздних стадиях наблюдались значительно более высокие

уровни РЭА, СА125 и СА15-3 по сравнению с пациентами на ранних стадиях. Статистический анализ показал, что повышенные уровни СА125 и СА15-3, очевидно, были связаны с пациентами с большим диаметром опухоли (> 5 см) и метастазами в лимфатические узлы. Кроме того, результаты исследования продемонстрировали, что уровни СА125 в сыворотке демонстрировали статистические различия между различными молекулярными подтипами, причем наиболее частое повышение происходило в трижды отрицательных опухолях. Таким образом установлено, что уровни РЭА, СА125 и СА15-3 в сыворотке могут быть более эффективными для мониторинга распространенных опухолей, чем ранняя диагностика [3]. Высокие уровни СА125 могут отражать опухолевую нагрузку и связаны с агрессивным молекулярным подтипом, что позволяет предположить, что его можно использовать для прогнозирования неблагоприятного исхода и прогноза у пациентов с РМЖ. Laffont A., et al. (2018) оценили вклад СА 125 как индикатора отдаленных метастазов в ретроспективном исследовании популяции из 620 пациентов с РМЖ без метастатического распространения или метастатическим РМЖ. Установлено, что исходный уровень СА 125 связан с клиническим статусом TNM, статусом HER2, характером и количеством метастатических очагов. ROC-кривые и логистический регрессионный анализ показывают, что СА 125 является независимым прогностическим критерием наличия метастазов [119].

Сверхэкспрессия HER2 при РМЖ может способствовать окислительно-восстановительному дисбалансу, который связан с повреждением и структурной модификацией многих биомолекул. Santos L.L.D. et al., (2022) выполнили исследование, в котором изучались волновые характеристики инфракрасного спектра, полученные с помощью анализа с преобразованием Фурье, что отражает химический состав образца крови [34] и таким образом, позволяет получить «биохимическую характеристику опухоли», [18] и их взаимосвязь с уровнями маркеров окислительно-восстановительного статуса, таких как восстановленный глутатион, супероксиддисмутаза, каталаза, железовосстанавливающие антиоксиданты и карбонилы белков у женщин с HER2 + РМЖ, HER2 – РМЖ и

доброкачественными заболеваниями молочной железы. Полученные результаты показали, что случаи РМЖ HER2+ можно отличить от случаев РМЖ HER2- и доброкачественных заболеваний молочной железы по более низкой антиоксидантной способности сыворотки. В сыворотке крови женщин с РМЖ уровень фермента СОД наиболее высок, и эта характеристика позволили отличить их от HER2 – РМЖ. Данные о серологической антиоксидантной способности FRAP позволяют оценить биохимические изменения, которые происходят до появления клинических признаков.

1.2.2 Биомаркеры рака молочной железы в ротовой жидкости

В последние десятилетия все больше возрастает интерес к использованию слюны в качестве дополнительного теста, улучшающего традиционные подходы выявлению и скринингу РМЖ поскольку слюна является альтернативой крови и другим биологическим жидкостям в качестве источника потенциальных биомаркеров [9, 132, 172]. Недавние подходы к разработке слюнных биомаркеров выявили значительный прогресс в клиническом их применении (таблица 2). Несколько биомаркеров для систематического обнаружения РМЖ были идентифицированы и проверены на доклиническом уровне. Предполагается, что профиль опухолевых маркеров в слюне может быть дополнением к современным методам, используемым для диагностики РМЖ. Исследование, направленное на выявление слюнных биомаркеров, присутствующих на начальных стадиях РМЖ, когда гистопатологический анализ еще не обнаруживает клеточных изменений, провели Gilson Sena I.F. et al. [105]. Авторы установили, что белки, связанные с метаболическими изменениями, воспалительным процессом и деградацией клеточного матрикса, обнаруживаются в слюне в начале развития опухоли. Эта работа продемонстрировала, что профили белков слюны можно использовать для выявления клеточных изменений, связанных с предраковой стадией РМЖ, с помощью неинвазивных средств, даже до выявления заболевания при биопсии.

Таблица 2 – Онкомаркеры рака молочной железы в ротовой жидкости

Онкомаркеры РМЖ в ротовой жидкости	Источник информации
Раковый антиген CA15-3	13, 113, 189
HER2/neu, c-erbB2	58, 117
Аутоантитела против HER2 и MUC1	207
РЭА (раково-эмбриональный антиген), CA125	13
Белки слюны	96, 140
Альфа-фетопротеин (АФП)	189
Эпидермальный фактор роста (EGF)	180
Белок резистентности легких (LRP)	208
Продукты, нарушающие слюварный окислительно-восстановительный статус	35, 174
Сиаловая кислота	76, 77
Лектин	21, 175
Гликопротеины	159
Полиамины, N-ацетилированные соединения	178
Свободные аминокислоты	178
мРНК	188
микроРНК	55, 133
Мутации генов BRCA1 и BRCA2	169

Первоначальные исследователи слюнных биомаркеров обозначили рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 (Her2/neu – human epidermal growth factor receptor-2) слюны в качестве вероятного биомаркера РМЖ, поскольку ранее было показано, что он присутствует на мембране эпителия протоков тканей желез [102, 157, 197]. Кроме того, Her2/neu был обнаружен в сыворотке [86] что, дало исследователям основу для аналитического сравнения содержания этого протеина в слюне и крови [101]. В совокупности эти данные послужили основой для выбора Her2/neu в качестве саливабиомаркера.

Streckfus C., et al., (2000) обнаружили в слюне здоровых женщин, женщин с доброкачественными поражениями молочной железы и женщин с

диагностированным РМЖ признанные онкомаркеры c-erbB-2, раковый антиген 15-3 (CA15-3) и белок-супрессор онкогена 53 (p53) [197]. Однако уровни c-erbB-2 и CA15-3 у больных РМЖ были значительно выше, чем уровни в слюне здоровых субъектов и пациентов с доброкачественными опухолями. И наоборот, уровни p53 были выше у контрольных субъектов по сравнению с женщинами с РМЖ и женщинами с доброкачественными опухолями. Хотя катепсин-D и рецептор эпидермального фактора роста были обнаружены, они не продемонстрировали какой-либо четкой корреляции со статусом заболевания. В настоящее время Her2/neu, вероятно, является наиболее тщательно изученным биомаркером, присутствующим в слюне больных РМЖ [156, 197], который все еще находится в стадии изучения [58, 117, 207]. Результаты этих исследований продемонстрировали повышенные концентрации белков Her2/neu и CA15-3 в слюне и сыворотке крови у больных РМЖ, которые были значительно выше, чем уровни в слюне и сыворотке здоровых людей и пациентов с доброкачественными опухолями. de Abreu Pereira D. et al. (2013) исследовали возможность измерения растворимого HER2 в слюне пациентов с риском развития РМЖ с целью ранней диагностики и прогноза заболевания [131]. Несмотря на то, что медианные значения HER2 увеличивались в зависимости от тяжести клинического статуса, не было обнаружено существенного различия при сравнении медиан среди групп пациентов. Кроме того, было обнаружено, что белок Her2/neu равен или превосходит способность CA15-3 выявлять больных раком. Чувствительность и специфичность составили 87 и 65 % соответственно, с пороговой точкой 100 ЕД/мл. Эти результаты были сопоставимы с уровнями Her2/neu в сыворотке. Также оценивали стадирование опухоли и статус рецепторов. Her2/neu увеличивался со стадией, но не со статусом опухоли. Позднее это открытие было поддержано другими исследователями [207]. Bel'skaya L.V., Sarf E.A. (2022) показали, что для различных подтипов РМЖ характерны различные изменения профиля биомаркеров слюны [35]. Показано, что состав слюны больных базальноподобным РМЖ максимально отличался от контрольной группы. Биохимический состав слюны больше варьирует в зависимости от статуса HER2 и

статуса эстрогеновых рецепторов и в меньшей степени – от статуса рецепторов прогестерона. Было обнаружено, что группа HER2 (-)/HER2 (+), которую следует рассматривать как единую группу, а также ER-положительный РМЖ статистически значимо отличались от контрольной группы. Для ER/PR-положительного РМЖ также отмечено более благоприятное соотношение биохимических показателей слюны.

Эпидермальный фактор роста (EGF) является регуляторным белком, ответственным за рост и восстановление тканей. Поскольку избыточная экспрессия EGF вовлечена в онкогенез, он может быть полезен в качестве онкомаркера. Основываясь на этом, Navarro M.A. et al., (2009) продемонстрировали, что концентрация EGF была выше в слюне женщин с первичным или рецидивирующим РМЖ по сравнению с женщинами без РМЖ. Самые высокие концентрации EGF были обнаружены в подгруппе местного рецидива, что предполагает потенциальное использование этого маркера в послеоперационном наблюдении за пациентами с диагностированным раком [180].

Wood N., Streckfus C.F. (2015) исследовали экспрессию белка резистентности легких (LRP) в слюне и предложили рассматривать новый белок в качестве прогностического индикатора РМЖ. Показано, что присутствие солубилизированной формы онкогенного белка LRP в стимулированной цельной слюне позволило отличить здоровых женщин от женщин с подтвержденным РМЖ I стадии. Результаты показали, что LRP находится в значительно более высоких концентрациях в слюне больных РМЖ по сравнению со здоровыми женщинами [212].

Brooks M.N. et al. (2008) в исследованиях на контрольных субъектах и пациентках с РМЖ продемонстрировали, что РЭА значительно повышен в слюне больных РМЖ по сравнению со здоровыми контрольными субъектами [180].

Показано увеличение концентрации СА15-3 в слюне больных РМЖ по сравнению со здоровыми людьми [13], что согласуется с данными, представленными в работах [89, 207]. Повышенные уровни СА15-3 чаще встречаются у пациентов с распространенным РМЖ, чем у пациентов с ранним

РМЖ. Зафиксировано значительное повышение концентрации этого маркера как при доброкачественных заболеваниях молочных желез, так и при РМЖ *in situ*. Также показано наличие положительной значимой корреляции между концентрациями СА15-3 в сыворотке и слюне здоровых людей. При пороговых значениях 5,5 нг/мл для СА15-3 и 85 нг/мл для РЭА РМЖ можно диагностировать с чувствительностью 80 % и специфичностью 70-75 %.

СА15-3 – наиболее широко используемый маркер для выявления рецидивирующего РМЖ и мониторинга лечения пациентов с запущенным заболеванием [206]. Были предложены несколько гипотетических механизмов, объясняющих присутствие в слюне больших молекул, таких как СА15-3. Предлагаемая гипотеза заключается в том, что активный транспорт белков в слюну железистым эпителием слюнных желез может объяснить присутствие мембраносвязанных белков, таких как СА15-3. У пациентов с РМЖ может наблюдаться переизбыток различных биологически активных белков, связанных с быстрым аномальным ростом новообразования, что, в свою очередь, может вызывать ответную реакцию в слюнных железах [208]. В недавних проспективных исследованиях биомаркеров слюны при РМЖ средняя концентрация СА125 в слюне составила 102,1 пг/мл в контрольной группе и 267,6 пг/мл в группе пациентов с РМЖ. Авторы полагают, что исследование СА125 слюны является многообещающим инструментом в диагностике РМЖ.

В недавней работе Коораie М. et al. (2022) провели метаанализ и систематический обзор исследований, связанных с оценкой диагностической ценности биомаркеров слюны для дифференциации пациентов с РМЖ и контрольной группы [171, 179]. Опубликованные статьи содержали 121 единицу исследования с 8639 взрослыми субъектами (4 149 пациентов с РМЖ и 4 490 контрольных без рака). Суммарная специфичность и чувствительность составили 0,727 и 0,717 соответственно. Объединенные значения отрицательных и положительных отношений правдоподобия (NLR и PLR) составили 0,396 и 2,597 соответственно. Номограмма Фагана всесторонне учитывающая PLR и NLR и корректирующая отношения правдоподобия в соответствии с априорной

вероятностью диагноза для биомаркеров слюны показала посттестовые вероятности 28 % и 72 % для отрицательных и положительных результатов соответственно, что свидетельствует о полезности биомаркеров слюны для выявления РМЖ. Метаанализ показал, что слюна может быть многообещающим, эффективным и неинвазивным биоматериалом, содержащим биомаркеры, позволяющие точно отличить больных РМЖ от здоровых людей. Нестимулированная слюна имеет более приемлемую диагностическую ценность по сравнению со стимулированной слюной при РМЖ.

Для более глубокого понимания потенциала биомаркеров, полученных из слюны, и их сопоставимости с биомаркерами, из сыворотки, Hofner M. et al. (2023) исследовали белковые биомаркеры, а также профили опухолеспецифичных аутоантител в слюне и соответствующих образцах сыворотки, полученных от одного и того же человека. С этой целью были проанализированы профили опухолевых аутоантител в образцах сыворотки и слюны, полученных от пациентов с РМЖ и контрольных пробандов, используя целевую матрицу белков РМЖ, включающую около 700 ранее выбранных классифицирующих антигенов. Анализ данных скрининга опухолевых аутоантител выявил классификатор, способный отличить РМЖ от контроля в сыворотке (199 маркеров), а также в слюне (133 маркера). 87 маркеров из обоих наборов перекрываются. Таким образом, продемонстрирована возможность проведения скрининга белковых опухолевых маркеров, как в образцах сыворотки, так и в слюне. Вполне сопоставимые профили аутоантител в сыворотке и слюне подчеркивают высокий потенциал биомаркеров на основе белков слюны [68].

Несмотря на признание роли саливадиагностики для выявления раковых заболеваний, отсутствие фундаментального обоснования транспорта биомаркеров из дистальной опухоли в ротовую жидкость потенциально может снизить ценность диагностического исследования слюны [64, 103]. Однако исследования, сфокусированные на секреции экзосом и биогенезе молекул-биомаркеров, внесли вклад в понимание этого феномена [205, 210]. В экспериментах с использованием линии клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 и клеток

подчелюстной железы Lau C.S., Wong D.T. (2012) продемонстрировали, что экзосомоподобные микровезикулы, происходящие от клеток РМЖ, способны взаимодействовать с клетками слюнных желез, изменяя состав их секретируемых микровезикул. Авторы обнаружили, что клетки слюнных желез секретируют экзосомоподобные микровезикулы, таким образом, инкапсулируя как белки, так и мРНК [118].

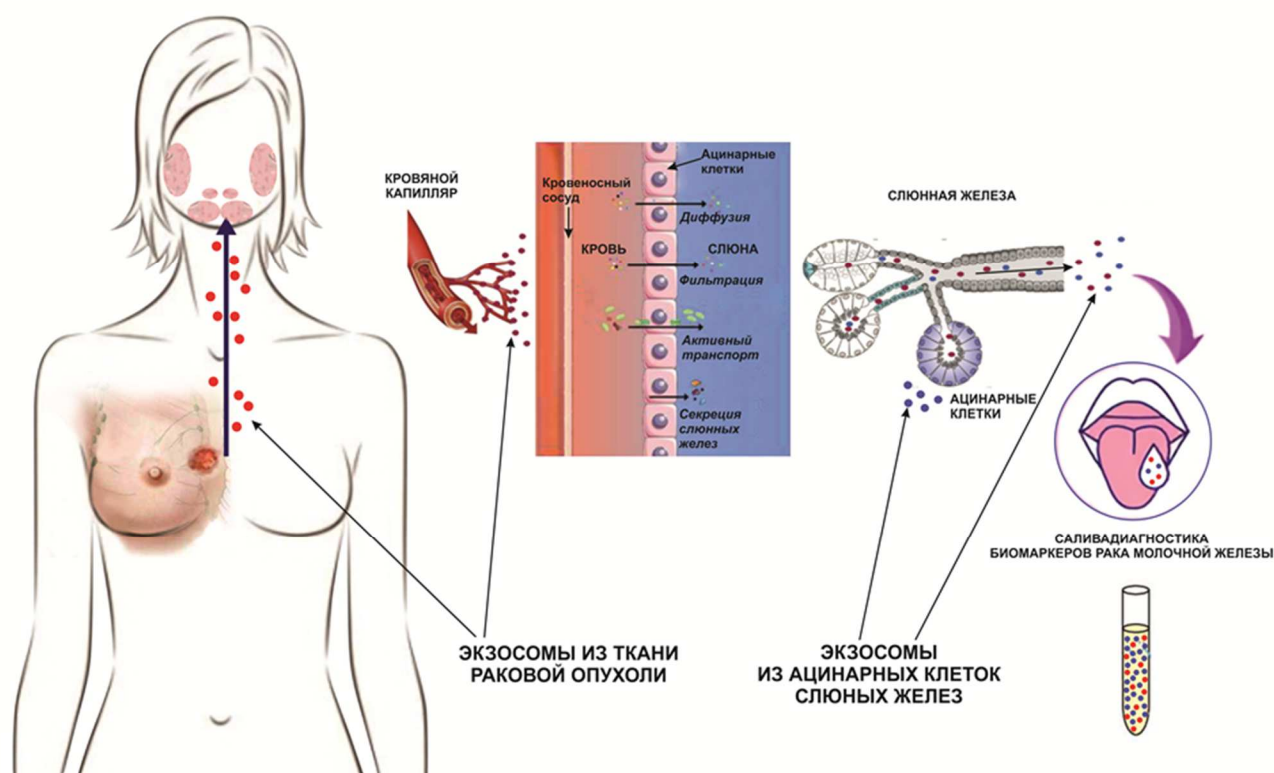


Рисунок 1 – Предполагаемый путь раковых экзосом из рака молочной железы в ротовую жидкость

Информация о механизме происхождении дискриминационных слюнных биомаркеров при дистальных системных заболеваниях дает понимание путей секреции и транспорта экзосом (рисунок 1). Известно, что экзосомы, полученные из раковых клеток, являются богатым источником информации, которая отражает генетический состав и статус их родительских опухолей. Экзосомный перенос из дистальной опухоли происходит через кровообращение в слюнные железы. Два типа экзосом, несущих раковое содержимое, высвобождаются в слюну либо посредством экзоцитоза (раковые экзосомы), либо путем слияния клеточной

плазматической мембраны с мультивезикулярными тельцами (ацинусные экзосомы).

Вышеизложенная информация, а также не упомянутые в данном обзоре из-за существующих ограничений его объема данные литературы, позволили объединить и представить в таблице 1 основной пул существующих сведений о сывороточных, а в таблице 2 слюварных биомаркерах рака молочной железы.

1.3 Взаимосвязь между содержанием онкомаркеров рака молочной железы в крови и ротовой жидкости

Было показано существование положительной корреляции между экспрессией ряда биомаркеров в сыворотке крови и в слюне, поскольку у больных раком экспрессия специфических биомаркеров выше по сравнению с больными без рака.

Bigler L.G. et al. (2002) исследовали вопрос о полезности тестирования Her2/neu слюны и сыворотки для наблюдения за пациентами с различными стадиями РМЖ до и после лечения [196]. Исследование Her2/neu и CA15-3 проводили в стимулированных образцах ротовой жидкости и сыворотке пациенток, собранных у пациентов до какой-либо терапии или хирургического вмешательства и последовательно взяты во время терапии и после лечения. Результат исследования продемонстрировал модуляцию концентраций Her2/neu в ответ на химиотерапевтическое лечение и, кроме того, данный биомаркер может быть полезен для обнаружения рецидива после лечения. Her2/neu слюны может иметь потенциал для отслеживания успеха лечения и определения тактики терапии. Определение Her2/neu в слюне также отражало определение в сыворотке Her2/neu и CA15-3.

Streckfus C. et al. (2000) проанализировали содержание белка c-erbB-2 в слюне и сыворотке у трех разных групп женщин (здоровых, женщин с

доброкачественными образованиями молочной железы и женщин с диагнозом РМЖ) чтобы определить диагностическую ценность этого онкогена [197]. Для сравнения относительной диагностической полезности белка c-erbB-2 также измеряли СА15-3. Измерения СА15-3 служили «золотым стандартом» для сравнения диагностической эффективности белка c-erbB-2. Результаты исследований показали повышенные концентрации белков Her2/neu и СА15-3 в слюне и сыворотке женщин всех трех групп. Уровни Her2/neu в слюне и серологические уровни у больных раком были значительно выше, чем уровни в слюне и сыворотке здоровых людей и пациентов с доброкачественными опухолями. Было обнаружено, что белок Her2/neu равен или превосходит способность СА15-3 обнаруживать больных раком. Чувствительность и специфичность составили 87 и 65 %, соответственно, с точкой отсечения 100 ЕД/мл. Эти результаты были сопоставимы с исследованиями Her2/neu в сыворотке [197].

В недавнем исследовании Assad D.X. et al. (2020) оценили концентрации СА15-3 в слюне и крови пациентов с РМЖ с применением новых диагностических тестов хемилюминесцентного и электрохемилюминесцентного анализа [176]. Была обнаружена умеренная связь между СА15-3 в сыворотке и слюне у пациентов с РМЖ [71]. Установлено, что слюна здоровых добровольцев и больных различными подтипами РМЖ различается по 12 биохимическим показателям: концентрациям белка, мочевины, оксида азота, малонового диальдегида, содержанию общих аминокислот, активности лактатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтрансферазы, каталазы, амилазы, супероксиддисмутаза и пероксидазы. Изменения биохимических показателей свидетельствовали об усилении процессов перекисного окисления липидов и эндогенной интоксикации и ослаблении антиоксидантной защиты, что коррелирует с тяжестью заболевания и наименее благоприятным прогнозом для РМЖ [35–40]. В той же лаборатории [35] также продемонстрировано, что при протоковом РМЖ более выражены изменения активности метаболических ферментов слюны, тогда как при дольковом РМЖ изменились показатели ферментативного и неферментативного компонентов антиоксидантной защиты.

1.4 Маркеры окислительного стресса в сыворотке крови и ротовой жидкости у пациентов с раком молочной железы

Активные формы кислорода (АФК) представляют собой важный фактор канцерогенеза и могут играть роль в иницировании и прогрессировании опухолей. Повышенные уровни АФК были обнаружены почти при всех видах рака, где они способствуют многим аспектам развития опухоли. Однако опухолевые клетки также экспрессируют повышенные уровни антиоксидантных белков для детоксикации от АФК, что позволяет предположить, что для функционирования раковых клеток необходим тонкий баланс внутриклеточных уровней АФК. Кроме того, генерируемый радикал, место его образования, а также локальная концентрация важны для клеточных функций АФК при раке [121]. Раковые клетки индуцируют более высокие уровни АФК, которые дополнительно стимулируют злокачественный фенотип через стимул к устойчивой пролиферации, уклонению от апоптоза, ангиогенезу, инвазивности и метастазированию. Роль АФК в этиологии и прогрессировании РМЖ постепенно выясняется [200]. Предполагается, что индукция АФК и окислительный стресс как следствие нарушения баланса между прооксидантами и антиоксидантами участвует в индукции и прогрессировании РМЖ. Свободные радикалы стимулируют окислительное повреждение ДНК, способствуя мутагенезу, который имеет важное значение для процесса инициации РМЖ [87]. Степень этого повреждения, вызванного АФК, может быть минимизирована ферментативными (каталаза (КАТ), супероксиддисмутаза (СОД) и глутатионпероксидаза (ГПО)) или неферментативными (витамины А, С и Е, селен и восстановленный глутатион (GSH) [59] механизмами антиоксидантной защиты. Однако повышенная антиоксидантная защита, которая уравнивает окислительный статус в раковых клетках, предполагает, что высокие уровни АФК могут предотвращать онкогенез с помощью различных механизмов [199]. Антиоксиданты широко исследовались для противодействия канцерогенезу молочной железы и

прогрессированию опухоли в качестве химиопрофилактических средств; однако появляется все больше данных, указывающих на их потенциал в качестве адъювантов для лечения РМЖ [29]. Эндогенные факторы могут играть важную роль в воздействии окислительного стресса на канцерогенез молочной железы. Генетическая изменчивость ферментов, которые приводят к увеличению производства АФК и тех, которые защищают клетку от окислительного стресса, также может влиять на риск заболевания. Ambrosone C.B. et al. (2000) проанализировали связи факторов риска РМЖ с окислительным стрессом включая возможную роль генетических полиморфизмов ряда ферментов, которые могут играть важную роль в воздействии на уровни АФК, которым подвергается клетка, а также тех, которые защищают клетку от окислительного стресса [23]. Слюна может быть использована для изучения оксидативного стресса наряду с кровью, так как слюна содержит антиоксидантные ферменты (КАТ, СОД, ГПО), витамины-антиоксиданты (А, Е, С), из крови в слюну поступают продукты перекисного окисления липидов [28, 145].

Основываясь на этом подходе, в ряде исследований оценивали антиоксидантный профиль в крови и ротовой жидкости пациентов с РМЖ. Во многих сообщениях указывается на развитие окислительного стресса у больных РМЖ [54]. Значительно более низкие уровни общей антиоксидантной активности (АОА) и более высокое содержание МДА в сыворотке больных, т.е. повышенный окислительный стресс, были обнаружены у пациенток с РМЖ по сравнению с контрольной группой. Из белков, гиперэкспрессированных в высокометастатических линиях РМЖ, интерес представляют белки-супероксиддисмутазы (СОД1, СОД2, СОД3) – ферменты, регулирующие баланс АФК и перекисных радикалов в клетке. Изменение уровня $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 в митохондриях модулирует молекулярные механизмы апоптоза, клеточной адгезии и пролиферации клеток и, следовательно, играет ключевую роль в развитии рака. Обнаружено, что нарушение функции генов СОД2 и СОД3 связано с высоким риском развития РМЖ и других опухолевых заболеваний. В исследовании [123] образцы плазмы больных РМЖ показали повышенный уровень перекисного

окисления липидов по сравнению с соответствующими контрольными образцами. Это сопровождалось значительным повышением как ферментных, так и неферментных антиоксидантов, о чем свидетельствует уровень ТБКРП и повышенная активность СОД, КАТ, ГПО, GSH и глутатионтрансферазы. Показано, что сывороточные уровни МДА и GSSG были значительно выше, а сывороточные уровни GSH, АОА и отношения GSH/GSSG значительно ниже у пациентов с РМЖ, чем в контрольной группе. После операции сывороточные уровни МДА и GSSG были значительно снижены, а сывороточные уровни GSH значительно повышены по сравнению с их уровнями до операции. Было обнаружено, что повышенные уровни МДА и GSSG и сниженные уровни GSH, АОА и соотношения GSH/GSSG значительно увеличивают риск РМЖ. Авторы констатировали, что все проанализированные биомаркеры можно использовать для прогнозирования РМЖ, при этом МДА и GSH превосходят по информативности другие биомаркеры.

Antonio Luiz Gomes Júnior et al. (2015) оценили окислительный стресс у пациентов с РМЖ путем анализа ферментативных и неферментативных параметров эритроцитов по уровню сывороточных веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРП), содержанию нитритов, концентрации GSH и активности ГПО, КАТ и СОД [184]. Результаты исследования продемонстрировали повышение уровней ТБКРП и СОД и снижение активности ГПО у пациентов с РМЖ, по сравнению с контрольной группой, подтверждая предыдущие исследования [209] и предполагая серьезное перекисное окисление липидов. Таким образом, пациенты с РМЖ имели антиоксидантный статус, указывающий на окислительный стресс.

Badid N. et al. (2010) показали, что активность СОД в плазме увеличивается у пациентов с больных протоковым РМЖ по сравнению с пациентами с доброкачественными опухолями, предполагая, что это может отражать реакцию на окислительный стресс, а затем может предсказывать состояние избытка АФК в процессе канцерогенеза [144]. Тем не менее, Gupta R.K. et al. (2012) обнаружили,

что уровни МДА и NO повышены у больных РМЖ по сравнению со здоровыми субъектами, а уровни ТАС в сыворотке, как и активность СОД и GSH-Px снижены по сравнению с контролем. Авторы предположили, что свободные радикалы индуцируют перекисное окисление липидов и перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот со снижением активности ферментных антиоксидантов при РМЖ [109].

Sinha R.J. et al. (2009) оценили в крови и ткани молочной железы пациенток с РМЖ и здоровых лиц контрольной группы уровни циркулирующего МДА и активности СОД и КАТ и выявили повышенный уровень свободных радикалов и низкий уровень СОД и КАТ в онкотрансформированной ткани молочной железы [106]. Повышенная концентрация перекиси липидов обнаружена в тканях больных РМЖ, о чем свидетельствует увеличение среднего уровня МДА при увеличении стадии РМЖ. Результаты исследования свидетельствуют, что у больных РМЖ активность свободных радикалов повышается, а механизм антиоксидантной защиты ослабевает. Pande D. et al. (2011) оценили диагностическую ценность маркеров окислительного повреждения у пациентов с РМЖ [209]. Исследование уровней в крови 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина (8-ОН-dG), карбонила белка и МДА вместе с ТАС показало увеличение маркеров окислительного повреждения, которое сопровождалось значительным снижением ТАС, у пациентов с РМЖ по сравнению с контрольной группой. Констатировано, что 8-ОНdG и PC являются лучшими индикаторами для отличия больных раком от контрольной группы, за которыми следуют МДА и ТАС. Результаты исследования Didžiapetrienė J. et al. (2020) подтвердили изменения перекисного окисления липидов у больных РМЖ, которые приводят к окислительному стрессу, а основным показателем окислительного стресса является уровень МДА [143]. По данным Ramírez-Expósito M.J. et al., (2014) пациенты с РМЖ показали снижение активности КАТ, СОД, GSH и ГПО и повышение уровней ТБКРП [62].

Sawczuk B. et al. (2019) оценивали активность антиоксидантных ферментов слюны, концентрацию полифенолов и ТАС у пациенток с BRCA1-зависимым

РМЖ [174]. Из всех этих параметров ТАС имеет особую клиническую ценность, поскольку позволяет определить совокупную способность всех антиоксидантных систем предотвращать окислительное повреждение. Показано, что активность слюнной пероксидазы в слюне была значительно выше у пациенток с РМЖ по сравнению с контрольной группой. Следует подчеркнуть, что слюнная пероксидаза является единственным антиоксидантом, синтезируемым исключительно в слюнных железах. Таким образом, активность слюнной пероксидазы отражает предотвращение окислительного стресса слюнными железами. Анализ данных, полученных Sawczuk B. et al. (2019), позволил предположить, что повышение активности пероксидазы в слюне больных BRCA1-зависимым РМЖ свидетельствует об усилении ферментативной антиоксидантной защиты [174]. В этом исследовании также показано повышение активности СОД и снижение активности КАТ каталазы у больных РМЖ, достигающее минимального значения при метастатическом РМЖ. Результаты исследования показали, что слюна больных РМЖ с мутацией BRCA1 характеризуется повышенной антиоксидантной способностью и более высокой степенью окислительного повреждения белков и липидов. Показано, что пероксидаза слюны, конечные продукты усиленного гликирования, АОА и МДА могут иметь особое клиническое значение в неинвазивной диагностике РМЖ. В недавнем исследовании Danesh H. et al. (2022) проанализировали связь между параметрами окислительного стресса и гематологическими показателями у больных РМЖ и показали, что эти пациенты имели значительно повышенные уровни гемоглобина, гематокрита, среднего объема эритроцитов и среднего корпускулярного гемоглобина по сравнению со здоровыми субъектами. Кроме того, были значительно повышены параметры окислительного стресса, такие как СОД, КАТ, общий оксидантный статус и общая антиоксидантная способность. Глутатионпероксидаза и МДА были значительно ниже у больных РМЖ, чем в контрольной группе [30].

1.5 Генетические маркеры риска рака молочной железы

Наследственные раковые синдромы, возможно, являются наиболее распространенной категорией генетических заболеваний, поскольку, по крайней мере, 2 % предположительно здоровых людей являются носителями высокопроникающих вариантов патогенов, предрасполагающих к опухоли. Наследственный рак молочной железы и яичников и синдром Линча вносят наибольший вклад в заболеваемость раком [5, 7, 100]. В процессе разработки индивидуального профиля риска развития РМЖ в семьях с сильными паттернами РМЖ были идентифицированы два гена восприимчивости к РМЖ BRCA1 и BRCA2 [19]. Эти два гена кодируют белки-супрессоры опухоли, мутации которых индуцируют от 25 до 40–50 % случаев наследственного РМЖ и могут быть обнаружены как у женщин, так и у мужчин [81, 99]. Последние десятилетия изучение генетических аспектов РМЖ в большей части было направлено на анализ BRCA1- и BRCA2-мутаций. Гены-супрессоры опухолей BRCA1 и BRCA2 являются двумя основными генами предрасположенности к РМЖ и раку яичников, и было показано, что вредные мутации в этих генах вносят вклад в патогенез рака груди / яичников (van der Groep P. et al. 2011). Хорошо известно, что значительная часть случаев наследственного РМЖ вызваны дефектами генов высокой пенетрантности BRCA1 [92], BRCA2 [72] и TP53 [202]. Несколько генов промежуточной пенетрантности (CHEK2, ATM, PALB2 и RAD50) ответственны примерно за 5 % случаев [50, 164]. Таким образом, генетическое тестирование изменений в BRCA1 и BRCA2 может использоваться для прогнозирования индивидуального риска развития РМЖ у пациентов с семейным анамнезом наследственного рака груди. История генетического тестирования при оценке риска РМЖ восходит к началу 1990-х годов [181]. Подтвержденные в настоящее время общие генетические вариации были обобщены в моделях прогнозирования риска и предлагают первую возможность оценить осуществимость в рамках программ раннего выявления и скрининга [49, 154]. Генетическое тестирование

для подтверждения наличия наследственных мутаций в этих генах может помочь пациентам принять надлежащие профилактические меры, что приведет к меньшему количеству смертей от рака. Тем не менее, существуют серьезные опасения относительно использования BRCA1 и BRCA2 для генетического тестирования из-за вариабельности возможного начала РМЖ, а также конечного результата. Кроме того, женщины с семейным риском без каких-либо мутаций в BRCA1 или BRCA2 по-прежнему подвержены риску развития РМЖ после отрицательного теста на один из этих генов [141].

На сегодняшний день в генетическом тестировании для оценки риска преимущественно предпочтение отдается анализам крови. Большинство лабораторий используют цельную кровь для генетических тестов BRCA. Для взятия образцов крови требуется квалифицированный специалист, а связанные с процедурой боль, стресс и беспокойство могут вызывать дискомфорт у обследуемых лиц, что проблематично в случае генетических тестов для прогнозирования риска, таких как тестирование BRCA, когда тестируемый человек часто совершенно здоров [14].

Чтобы сравнить ДНК, выделенную из образцов крови, и ДНК из слюны в отношении обнаружения мутаций зародышевой линии, секвенировали ДНК крови и слюны разных людей с известными мутациями в локусах BRCA1 или BRCA2 [169]. У всех исследуемых были обнаружены идентичные мутации BRCA1 и BRCA2 в ДНК из слюны и крови. Анализ проб слюны представляется достаточным средством для высокопроизводительного генотипирования, используемого для стратификации риска РМЖ в рамках программ раннего выявления и скрининга. Таким образом, слюна стала более удобным альтернативным источником геномной ДНК для генетического тестирования [163, 168]. Еще одно важное преимущество, связанное со слюной как источником геномной ДНК, – ее стабильность при хранении и транспортировке. Кровь обычно необходимо хранить в холодильнике перед обработкой для извлечения ДНК, а условия хранения и транспортировки могут отрицательно повлиять на выход и общее качество экстрагированной ДНК. Наборы для сбора слюны

доступны со стабилизирующими растворами, которые делают их стабильными даже при температуре окружающей среды [82].

Хорошо известно, что нарушение баланса между образованием и нейтрализацией АФК приводит к структурно-функциональным нарушениям, что определяется как окислительный стресс. Была обнаружена чрезвычайно важная, функция белка BRCA1. BRCA1 участвует в ответе на окислительный стресс, индуцируя экспрессию антиоксидантных ферментов. Предполагается, что BRCA1 также участвует в регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза клеток [129, 213]. Повышенный синтез АФК приводит к окислительному повреждению белков, липидов и ДНК, что является непосредственной причиной возникновения и прогрессирования РМЖ и других злокачественных новообразований. Нарушения окислительно-восстановительного баланса и тяжелые окислительные повреждения наблюдались как в сыворотке/плазме, так и в опухоли у больных РМЖ [122, 123].

Белок BRCA1 способен защищать клетки от оксидативного стресса посредством множественной активации экспрессии генов, ответственных за цитопротекторный антиоксидантный ответ [33]. В их числе гены, кодирующие ферменты глутатионтрансферазу и оксидоредуктазу, а также другие антиоксидантные гены. Установлено, что гиперэкспрессия гена/белка BRCA1 приводит к повышению устойчивости клеток к действию агентов-окислителей, а дефицит этого гена, наоборот, усиливает чувствительность к воздействию оксидативных факторов и вызывает избыток продукции АФК [46]. Показано, что BRCA1 регулирует внутриклеточные уровни АФК в нескольких клеточных линиях карциномы молочной железы и в неопухолевой линии эпителиальных клеток молочной железы человека. Мутация, связанная с РМЖ (Т300G или С61G), аннулировала способность BRCA1 снижать уровень АФК; и экспрессия мутантного белка Т300G фактически увеличивала уровни АФК, повышая вероятность того, что мутантный белок действует как доминантно-негативный [167].

BRCA1 также снижал уровни нитрования белков и H_2O_2 – индуцированных 8-оксогуаниновых повреждений в ДНК, двух показателей окислительного

повреждения клеточных макромолекул. Таким образом, BRCA1 может защищать целостность клеточных макромолекул. Результаты этого исследования показывают, что потеря эндогенного белка BRCA1, которая обычно наблюдается при спорадическом РМЖ [126], достаточна, чтобы вызвать повышение уровня АФК при онкотрансформации клеток и, таким образом, может способствовать развитию РМЖ. Показано, что в высокоинвазивных опухолевых клетках молочной железы, таких как MDA-MB-231, механизмы, которые регулируют внутриклеточные уровни АФК, участвуют в ингибировании как инвазии, так и миграции посредством дефицита OLA1 (отрицательного гена-регулятора антиоксидантного клеточного ответа) [116]. Более того, показано, что при оксидативном стрессе ген/белок BRCA1 значимо влияет на окислительно-восстановительный внутриклеточный статус, повышая соотношение восстановленной и окисленной форм глутатиона. Из белков, гиперэкспрессированных в высокометастатических линиях РМЖ, интерес представляет супероксиддисмутаза. Супероксид является одним из основных прооксидантов в клетке, поэтому СОД играет ключевую роль в антиоксидантной защите организма. Изменение уровня $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 в митохондриях модулирует молекулярные механизмы апоптоза, клеточной адгезии и пролиферации клеток и, следовательно, играет ключевую роль в развитии рака. Обнаружено, что нарушение функции гена СОД связано с высоким риском развития РМЖ и рака яичников (Zelco I. N. et al., 2002).

Результаты исследования Sawczuk B. et al. (2019) свидетельствуют, что слюна больных РМЖ с мутацией BRCA1 характеризуется повышенным антиоксидантным потенциалом и более высокой степенью окислительного повреждения белков и липидов, а также показали, что ТАС, имеющий особую клиническую ценность, поскольку позволяет определить совокупную способность всех антиоксидантных систем предотвращать окислительное повреждение, в слюне больных РМЖ с мутацией BRCA1 был значительно выше по сравнению с контрольной группой [174]. Это свидетельствует об адаптивной реакции организма на увеличение продукции АФК у больных РМЖ с мутацией BRCA1.

Данное исследование также указывает на потенциальную диагностическую ценность окислительно-восстановительных биомаркеров слюны в дифференциальной диагностике больных РМЖ с/без мутации BRCA1. Были выявлены параметры, которые могут иметь особое клиническое значение. Особого внимания в неинвазивной диагностике РМЖ заслуживают слюнная пероксидаза, конечные продукты усиленного гликирования, общий антиоксидантный статус, и МДА. Также представляется необходимым анализ соотношения биомаркеров слюна-кровь. Нарушения механизмов антиоксидантной защиты (уменьшение восстановленного глутатиона, повышение активности СОД, снижение глутатионпероксидазы) и выраженности окислительного повреждения клеток (увеличение содержания МДА, карбонильных групп белков, 8-OHdG) наблюдались в сыворотке крови больных BRCA1-зависимым РМЖ [123, 209].

1.6 Паратгормон-родственный протеин, как потенциальный биомаркер рака молочной железы

Благодаря прогрессу в молекулярной и системной биологии, биохимии и геномике в последние десятилетия понимание РМЖ значительно расширилось на клеточном, молекулярном и геномном уровнях. Существуют убедительные доказательства того, что очень значительный вклад в патофизиологию РМЖ вносит паратгормон-родственный протеин (ПТГрП) [44]. РМЖ был одной из исходных опухолей, из которых был очищен и секвенирован ПТГрП, из-за повышенной концентрации его циркулирующей формы [198]. ПТГрП продуцируется в двух третях случаев первичного РМЖ и в 90 % костных метастазов РМЖ [114]. Downey S.E. et al. (1997) обнаружили, что 100 % обследованных инвазивных карцином молочной железы имели иммунореактивность ПТГрП, а 96 % реагировали с антителами против его

рецептора [90]. Недавние исследования показали критическую роль ПТГрП в инициации, росте и метастазировании РМЖ (Zhang R. et al., 2019). Ghoussaini M., et al. (2012) объединили несколько наборов данных, охватывающих 70 000 пациентов и 68 000 контролей, для проведения общегеномных ассоциативных исследований для выявления новых локусов восприимчивости к РМЖ [94]. Один из трех новых локусов, которые они идентифицировали, rs10771399, содержит только один ген – ген ПТГрП. Эти результаты акцентируют внимание на ПТГрП как потенциальном факторе определяющем предрасположенность к РМЖ.

Zia M.K. et al. (2007) исследовали уровень экспрессии ПТГрП и его рецептора PTH1R при РМЖ человека и коррелировали уровень их экспрессии с клиническим исходом [120]. Авторы констатировали, что, экспрессия ПТГрП повышена у человека при РМЖ, особенно у пациентов с агрессивными опухолями. ПТГрП может также действовать как интракринный фактор, способствующий пролиферации опухоли [54, 162]. Существуют противоречия по поводу клинической или прогностической значимости экспрессии ПТГрП при первичном РМЖ. Доклинические и клинические исследования, оценивающие роль ПТГрП при РМЖ, дали неоднозначные результаты, в некоторых случаях указывая на то, что этот белок подавляет опухоль, а в других исследованиях – способствует росту. Из-за этих противоречивых данных ПТГрП получил ограниченное применение в качестве прогностического фактора общего прогрессирования рака молочной железы [115]. Grill V. et al. (1991) продемонстрировали, что уровни ПТГрП в плазме крови были повышены у 70 % женщин с гиперкальциемическим РМЖ и метастазами в костях [150]. Часто демонстрировалась экспрессия ПТГрП в первичном раке молочной железы у пациентов, у которых уже развился метастаз в кости [148]. Тем не менее, в нескольких исследованиях было высказано предположение, что экспрессия ПТГрП в опухоли может препятствовать ее прогрессированию и ассоциироваться с лучшим прогнозом на ранней стадии [158] и неинвазивным раком молочной железы [149]. Однако Takagaki K. et al. (2012) продемонстрировали, что экспрессия ПТГрП в первичном поражении свидетельствует о худшем исходе

[146]. В целом доклинические и клинические исследования подтверждают идею о двойной роли ПТГрП при РМЖ и показывают, что ПТГрП ингибирует прогрессирование опухоли на ранних стадиях заболевания [130], но действует противоположным образом, способствуя развитию опухоли и образованию метастазов при запущенных формах рака.

Otieno V.A. et al., (2016) разработали сверхчувствительный метод количественного определения в крови трех изоформ ПТГрП (ПТГрП 1-139, 1-141 и 1-173) и их фрагментов, содержащих N-концевые домены. Новые данные свидетельствуют, что циркулирующие концентрации изоформы ПТГрП 1-173 и его C-концевых фрагментов были лишь немного меньше, чем концентрации всех изоформ и их фрагментов. Результаты выявили значительную разницу между уровнями ПТГрП у здоровых людей по сравнению с больными раком. ROC – анализ дал 80–83 % клинической чувствительности и 96-100 % клинической специфичности для выявления рака. Результаты свидетельствуют о высоком потенциале иммуноанализа ПТГрП 1-86 и 1-173 для диагностики рака на ранней стадии [56].

Washam C.L. et al. (2013) выдвинули гипотезу о том, что у пациентов с РМЖ может быть выявлен протеомный профиль с возможностью различать пациентов с метастазами в кости или без них с высокой чувствительностью и специфичностью. Этот диагностический профиль был подтвержден путем анализа плазмы пациентов с РМЖ. Анализ выявил профиль из 13 белков, которые отличали пациентов с РМЖ с метастазами в кости от пациентов без метастазирования в кости с чувствительностью 97 % и специфичностью 82 % . Основным дискриминационным белком в профиле был идентифицирован как специфический и уникальный N-концевой пептидный фрагмент ПТГрП (12-48). Уровни ПТГрП (12-48) были измерены и были значительно выше у пациентов с РМЖ с метастазами в кости по сравнению с пациентами, не имеющими метастазов в костях. Результаты исследования показали, что ПТГрП (12-48) циркулирует в плазме пациентов с РМЖ и является новым прогностическим биомаркером костного метастазирования РМЖ. Ранее проведено сравнение уже

используемых сывороточных маркеров при распространенном РМЖ (РЭА и СА15-3) с более новым потенциальным маркером ПТГрП [112]. Констатируется, что ПТГрП не был ни более чувствительным, ни специфичным (90,1 %) сывороточным маркером по сравнению с РЭА или СА15-3. В то же время показано, что ПТГрП, обнаруживаемый в сыворотке, можно использовать для терапевтического мониторинга пациентов с диагнозом тройного отрицательного РМЖ [147]. В целом эти исследования проливают свет на уникальную и недостаточно изученную роль ПТГрП, который может оказывать значительное влияние на прогрессирование опухоли молочной железы. Однако точные функции ПТГрП в биологии РМЖ остаются невыясненными [162]. Понимание того, как именно этот белок способствует проопухолевому и опухолесупрессирующему фенотипам, важно не только для ответа на вопросы о роли ПТГрП в прогрессировании рака, но и для успешного использования белка в качестве биомаркера. Эта концепция не нова, но она остается упорно неразрешимой из-за ограниченного количества исследований и ресурсов, направленных на обнаружение и характеристику эффектов ПТГрП [115].

Вышесприведенная информация о ПТГрП свидетельствует о несомненной роли этого мультипотентного биологически активного белка в онкогенезе РМЖ, но не дает однозначного ответа на вопрос о целесообразности исследования его содержания в крови и в ротовой жидкости для использования в качестве биомаркера РМЖ. В рамках нашей диссертационной работы предпринята попытка получить данные, которые могут в некоторой степени способствовать выяснению значимости ПТГрП, как потенциального онкомаркера РМЖ.

Исследования проводились на базе лаборатории кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России и клинικο-диагностической лаборатории ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер №1» министерства здравоохранения Краснодарского края, оснащенные всем необходимым современным оборудованием.

2.1 Общая характеристика участников исследования

В настоящее исследование было включено 100 пациенток, средний возраст $42,4 \pm 4,5$ лет. Часть исследуемых лиц ($n = 50$) имели установленный диагноз рак молочной железы, которые проходили стационарное обследование и дальнейшее лечение в плановом порядке по медицинским показаниям. В исследование были включены женщины с впервые установленным диагнозом рак молочной железы: III стадии ($n = 19$) и IV стадии ($n = 31$). Диагноз был подтвержден гистологическими исследованиями (аденокарцинома), распределение по степени злокачественности представлено в таблице 3.

Кроме того, часть исследуемых ($n = 25$) были отнесены к группе лиц с подозрением на вероятность последующего возникновения онкопатологии молочных желез (группа риска). В данную группу были включены женщины, являющиеся родственниками больных РМЖ из основной группы исследования. Все исследуемые были обследованы с использованием методов биохимической идентификации специфических онкомаркеров, показателей окислительного

Таблица 3 – Распределение больных основной группы по гистологической степени злокачественности опухоли (G)

Категория G	Характеристика	Количество пациентов
Gx	Категория G не может быть определена	2
G1	Низкая степень злокачественности (благоприятный вариант), 3–5 баллов по шкале SBR ¹	9
G2	Умеренная степень злокачественности (промежуточный вариант), 6–7 баллов по шкале SBR	16
G3	Высокая степень злокачественности (неблагоприятный вариант), 8–9 баллов по шкале SBR	23
Примечание – SBR – шкала Scarff-Bloom-Richardson, Ноттингемская модификация.		

гомеостаза и наличия признаков, генетически ассоциированных с риском развития исследуемой онкопатологии. В образцах крови и ротовой жидкости исследовали содержания общего белка, ферментов (лактатдегидрогеназа, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза), электролитов и ряда других метаболитов биохимического профиля исследуемых биожидкостей. У части исследуемых пациентов исследовали содержание паратгормон-родственного протеина в плазме крови и в ротовой жидкости. В контрольную группу (n = 25) были включены лица женского пола без онкопатологии и иных выявленных на момент исследования заболеваний. Всем участникам исследования, согласно Федеральному закону «Об основах охраны здоровья граждан Российской Федерации» от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ (глава 2, статья 13, п. 3) выдавалась памятка о проводимом исследовании и ими было подписано информированное согласие.

При поступлении в стационар у всех пациентов собирали анамнез, проводили общий осмотр, общие клинические и лабораторные методы исследования, специальные методы исследования. Проведение исследований было одобрено на заседании независимого этического комитета ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (протокол № 92 от 13.10.2020 г.) и было основано на должных этических принципах.

2.2 Материалы исследования

Объектом биохимического исследования служили 100 образцов сыворотки или плазмы крови человека, и 94 образца ротовой жидкости больных раком молочной железы, лиц из группы риска развития онкопатологии и обследуемых контрольной группы.

Данные по молекулярно-биологическому типированию больных основной группы представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Суррогатное определение молекулярно-биологических подтипов рака молочной железы у больных основной группы

Молекулярно-биологический подтип	Клинико-патологическое (суррогатное) определение подтипа	Количество пациентов
Люминальный А	Наличие всех факторов: – РЭ положительные; – HER2 отрицательный; – Ki67 низкий ¹ ($\leq 20\%$); – РП высокие ² ($\geq 20\%$).	15
Люминальный В (HER2 отрицательный)	– РЭ положительные; – HER2 отрицательный и наличие одного из следующих факторов: – Ki67 высокий ($\geq 30\%$); – РП низкие ($< 20\%$).	11
Люминальный В (HER2 положительный)	– РЭ положительные; – HER2 положительный; – Ki67 любой; – РП любые.	12
HER2 положительный (не люминальный)	– HER2 положительный; – РЭ и РП отрицательные; – Ki67 любой	5
Базальноподобный	– отрицательные РЭ, РП, HER2 (тройной негативный протоковый)	7

2.2.1 Сбор крови

Образцы венозной крови и ротовой жидкости были собраны в один и тот же день у каждого участника исследования. Взятие крови осуществлялось после получения ротовой жидкости утром (с 9 до 11 часов), натощак, спустя 2–3 часа после сна, на фоне психоэмоционального покоя. Образцы крови (10 мл) были получены от каждого исследуемого субъекта путем венепункции локтевой вены и собраны в пробирки. Пробы крови и ротовой жидкости собирали в пробирки вакуумные стеклянные BD Vacutainer с крышкой BD Hemogard с K₃ЭДТА и аprotинином (Кат. номер REF 361017, Бектон Дикинсон энд Компани, США). После взятия, цельную кровь использовали для определения тиоловых групп, а также центрифугировали при 1 500 об/мин. (указать марку центрифуги и страну производитель) в течение 10 минут для получения образцов плазмы. Для дальнейшего исследования использовали как плазму, так и эритроциты. Эритроциты перед проведением биохимического анализа предварительно отмывали охлажденным физиологическим раствором. Часть образцы плазмы исследовали *ex tempore* в течение 1–3 часов в день забора крови, а другую часть переносили в пробирки на 1,5 мл, и хранили при –80 °С.

Чтобы образец соответствовал критериям исследования, он не должен был иметь признаков гемолиза.

2.2.2 Сбор образцов ротовой жидкости

Сбор образцов ротовой жидкости / слюны производили сами обследуемые пациенты в предоставленный стерильный пластиковый контейнер с закручивающейся крышкой. Все они получили подробную информацию в устной и письменной форме информацию 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 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 прополоскивали рот водой. Затем нестимулированную слюну собирали пассивным слюноотделением в отсутствие жевательных движений в стерильные пластиковые контейнеры на 10 мл. Сбор образцов проводили 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 сбора образцов, чтобы избежать стресса. 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. В этой связи все образцы были проверены путем визуального осмотра, и в исследование не были включены с признаками, указывающими на их загрязнение кровью. Сразу после сбора образцы ротовой жидкости/ слюны центрифугировали (скорость 8 000 об/мин, время 15 мин), для удаления нежелательных частиц (например, клеток), затем супернатант собирали и разделяли на аликвоты, удаляя осадок. Часть аликвот каждого образца хранили при 4 °C в течение 2–3 часов для производства биохимических и генетических исследований *ex tempore*. Максимальный срок хранения собранной слюны до момента передачи в лабораторию составлял 24 часа. Другие аликвоты помещали в промаркированные криопробирки и замораживали при –20 °C и при –80 °C. Чтобы свести к минимуму деградацию белков из-за ферментативного воздействия образцы биоматериалов хранили в пробирках производства фирмы BD Vacutainer с крышкой BD HemoGuard с КЗЭДТА и аprotинином (Кат. номер REF 361017, Бектон Дикинсон энд Компани, США). Аликвоты, хранящиеся при –20 °C, анализировали в течение 14 дней, а хранящиеся при –80 °C в течение 1–2 месяцев [10, 42].

2.3 Биохимические исследования крови и ротовой жидкости

Используемое оборудование:

- биохимический анализатор AU480 (Beckman Coulter, США);
- гематологический анализатор XN – 1000 (Stsmex Cjrporation, Япония);
- система для иммуноанализа UniCelDx1 (Beckman Coulter, США);

В сыворотке крови и ротовой жидкости колориметрическими методами определяли концентрацию общего билирубина, общего белка, мочевины, креатинина, глюкозы, общего холестерина, железа, калия, натрия, хлорид-ионов, С-реактивного белка, активность ЛДГ, АЛТ, АСТ, щелочной фосфатазы, альфа-амилазы.

2.4 Методы биохимической идентификации специфических онкомаркеров

2.4.1 Измерение содержания раково-эмбрионального антигена в сыворотке крови и ротовой жидкости

Количественное определение концентрации раково-эмбрионального антигена в сыворотке крови и ротовой жидкости было выполнено методом хемилюминисцентного иммунного анализа с использованием системы иммунооценки Access (Beckman Coulter Access Immunoassay Systems, США) и комплекта реагентов Access CEA (номер по каталогу 33200). Эта система представляет собой двухсайтный иммуноферментный («сэндвич») анализ, использующий два мышиных моноклональных антитела к РЭА, которые реагируют с разными эпитопами РЭА. Исследуемый образец добавляют в реакционную пробирку вместе с конъюгатом щелочной фосфатазы и первого

моноклонального антитела к РЭА и вторым моноклональным антителом к РЭА, связанным с парамагнитными частицами. После инкубации, магнитного разделения и отмывки в пробирку добавляют хемилюминисцентный субстрат и свечение, которое генерируется в процессе этой реакции пропорционально концентрации РЭА в пробе, измеряется иммунохимическим анализатором UniCelDx1(Beckman Coulter, США). Количество РЭА в исследуемой пробе рассчитывается автоматически программным обеспечением системы по многоточечной калибровочной кривой. Минимально определяемая ненулевая концентрация РЭА с достоверность 95 % составляет 0,1 нг/мл.

2.4.2 Измерение содержания ракового антигена СА15-3 в сыворотке крови и ротовой жидкости

Концентрацию антигена СА15-3 в исследуемых образцах биоматериала, определяли методом двухсайтного хемиллюминисцентного иммунного анализа с использованием системы Access BR Monitor. Использовали комплект реагентов Access BR Monitor (номер по каталогу 387620), содержащих моноклональные антитела к антигену СА15-3 и биоциды ProClin™ 300 в качестве консервантов. Исследование проводили путем внесения образца сыворотки крови или ротовой жидкости в реакционный сосуд, содержащий конъюгат мышинных моноклональных антител к антигену СА15-3 и щелочной фосфатазы и парамагнитные частицы, покрытые вторыми мышинными моноклональными антителами к антигену СА15-3. В ходе реакции антиген СА15-3 связывается с иммобилизованными в твердой фазе антителами к антигену СА15-3, в то время как конъюгированные со щелочной фосфатазой антитела реагируют другим антигенным сайтом молекулы СА15-3. После инкубации в реакционном сосуде материалы, переведенные в твердую фазу, помещаются в магнитное поле, а прочие материалы вымываются. Далее в сосуд вносят хемиллюминисцентный

субстрат, а свечение, генерируемое в результате реакции прямо пропорционально концентрации антигена СА15-3, измеряется люминометром. Количество исследуемого антигена в исследуемой биопrobe определяется по многоточечной калибровочной кривой.

2.5 Генетические исследования крови и ротовой жидкости

Взятие, предобработку и хранение исследуемого материала для исследований генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском развития онкопатологии проводили в соответствии с инструкцией к комплекту для выделения ДНК из биологического материала. 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 градусов С. 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, T300G в гене человека BRCA1 и 6174delT в гене человека 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. Набор предназначен для использования в клинко-диагностических лабораториях и научно-исследовательской практике. Материал для исследования – венозная кровь и ротовая жидкость. При заборе крови в качестве антикоагулянта использовать K₂ЭДТА. Качественные и количественные исследования ДНК проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Применяли амплификатор детектирующий «ДТ лайт» производства ООО «НПО ДНК-Технология» (Россия), совмещающий функции прецизионного программируемого термоциклера и оптической системы,

позволяющей регистрировать флуоресценцию реакционной смеси непосредственно в ходе полимеразной цепной реакции. Регистрация и интерпритация результатов ПЦР осуществлялась автоматически с помощью программного обеспечения Real Time_PCR v.7.3, поставляемого с детектирующим амплификатором.

2.6 Исследование показателей прооксидантно-антиоксидантной системы крови и ротовой жидкости

Для характеристики окислительного гомеостаза в крови и ротовой жидкости были определены: общая антиоксидантная активность, активность ферментов антирадикальной защиты (КАТ, ферменты метаболизма глутатиона – ГПО, глутатионредуктаза (ГР)), содержание восстановленной формы глутатиона, уровень белковых тиоловых групп, накопление продуктов окислительных повреждений биомолекул (ТБК-реактивные продукты или МДА).

2.6.1 Определение общей антиоксидантной активности

Определение общей антиоксидантной активности (АОА) является одним из центральных вопросов лабораторной диагностики окислительного стресса ввиду интегрального характера данного показателя. Для определения антиоксидантной активности (антиокислительной емкости) использовали железо-восстанавливающий метод (FRAP) [104, 151].

Для выполнения методики 0,05 мл неразбавленной плазмы крови или ротовой жидкости вносили в реакционную смесь, содержащую 10 мМ FeCl_3 и 7 мМ 2,2'-дипиридила в 0,1 М ацетатном буферном растворе с $\text{pH} = 3,6$, общим объемом 1,8 мл. Реакционную смесь инкубировали в термостате при 37°C в течение 30-ти минут после чего фотометрировали при 520 нм против холостой

пробы, содержащей дистиллированную воду вместо биожидкости. Полученные данные, выраженные в единицах оптической плотности, сравнивали с калибровочными данными, полученными при определении железо-восстанавливающей способности раствора аскорбиновой кислоты в концентрациях 0,1–5 мМ. Выражали конечные данные соответственно в мМ раствора аскорбиновой кислоты [1].

В рамках оценки общей антиоксидантной активности плазмы крови и гомогената ткани также определяли способность радикальной сорбции при использовании катиона радикала 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфоукислоты) или ABTS^{*+}. Предварительно подготавливали рабочий раствор ABTS^{*+} путем растворения 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфоукислоты) в 2,45 мМ растворе персульфата калия до конечной концентрации 7 мМ. Полученную смесь инкубировали в течение суток в защищенном от света месте при комнатной температуре.

Непосредственно перед выполнением определения способности радикальной сорбции разводили полученный рабочий раствор дистиллированной водой до получения раствора со значением оптической плотности $0,7 \pm 0,02$ при контроле на спектрофотометре на длине волны 734 нм. Выполнение методики заключалось во внесении 0,05 мл биожидкости (разведенная плазма крови физиологическим раствором в 3 раза или ротовая жидкость) в 1,5 мл раствора ABTS^{*+} с отслеживанием снижения оптической плотности в течение 3-х минут [104]. Расчет определяемого показателя осуществляли по формуле (1):

$$\text{Способность радикальной сорбции (\%)} = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100, \quad (1)$$

где A_0 – поглощение только реакционной смеси;

A_1 – поглощение реакционной смеси после окончания инкубации с биожидкостью.

Полученные данные, выраженные в %, сравнивали с данными, полученными при исследовании калибровочных растворов аскорбиновой кислоты в концентрациях 0,1–5 мМ. Также, как и в предыдущей методике конечный результат был выражен в мМ аскорбиновой кислоты, для возможности сравнения с результатами других исследователей.

2.6.2 Определение концентрации тиолсодержащих соединений

В качестве тиолсодержащих антиоксидантов нами рассматривались общие тиоловые группы плазмы крови, в основном представленные остатками цистеина белков, а также восстановленная форма глутатиона, локализованного преимущественно внутриклеточно. Для определения обоих параметров использовали метод, основанный на реакции SH-групп с 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислотой) (ДТНБ) или реактивом Элмана [11, 17].

Для определения тиоловых групп белков плазмы крови 0,15 мл биожидкости вносили в 1,5 мл 0,1 М натрий-калиевого фосфатного буферного раствора и добавляли 25 мкл 0,6 % -го метанольного раствора ДТНБ. Оптическую плотность раствора измеряли при 412 нм до внесения раствора ДТНБ и через 30 минут после. Полученные данные выражали в единицах оптической плотности с поправкой на концентрацию белка в биологической жидкости [69].

Для определения концентрации восстановленной формы глутатиона в эритроцитарной взвеси предварительно выполняли осаждение белков, мешающих определению. Использовали гемолизат эритроцитарной взвеси, разведенный холодной дистиллированной водой в десять раз. Для депротеинизации смешивали 0,6 мл биожидкости и 0,2 мл 20 %-й сульфосалициловой кислоты. После центрифугирования отбирали 0,2 мл надосадочной жидкости и вносили в 2,5 мл 0,1 М трис-HCl буферного раствора с pH = 8,5 и 0,01 % ЭДТА. Несколько более щелочной характер среды был необходим для нейтрализации ранее использованной сульфосалициловой кислоты. К полученной реакционной смеси добавляли 25 мкл 0,6 % -го метанольного раствора ДТНБ. Фотометрировали раствор при 412 нм, сравнивали полученные данные с результатами испытаний в аналогичных условиях калибровочных растворов глутатиона с концентрацией 0,1–5 мкмоль/мл [10, 69].

2.6.3 Определение продуктов перекисной модификации

Определение окислительно-модифицированных продуктов (ОМП) и проводили с помощью методики, которая основана на взаимодействии минорных продуктов пероксидации, содержащихся в ротовой жидкости, с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), что приводит к образованию окрашенного комплекса, интенсивность которого измеряли при длинах волн 450 и 532 нм.

Для определения ТБК-реактивных продуктов использовали трижды отмытую эритроцитарную взвесь или ротовую жидкость. Биожидкость в объеме 0,5 мл разбавляли таким же объемом физиологического раствора и инкубировали в течение 60-ти минут в термостате при 37 °С. После чего реакционную смесь депротеинизировали внесением 0,5 мл 20 %-го раствора трихлоруксусной кислоты. К полученной смеси добавляли 0,5 мл 0,8 % раствора 2-тиобарбитуровой кислоты и кипятили на водяной бане в течении 15-ти минут. После центрифугирования и отделения осадка, фотометрировали надосадочную жидкость на 2-х длинах волн – 450 и 532 нм. Результаты выражали как тиобарбитуровое число (ТБЧ) биопробы – сумма оптического поглощения растворов на 2-х вышеописанных длинах волн [1].

Тиобарбитуровое число ротовой жидкости (ТБЧ) рассчитывали с помощью формулы (2):

$$\text{ТБЧ} = (E_{o-452} + E_{o-450} - E_{k-532} - E_{k-450}) \times 0,5, \quad (2)$$

где E_{o-450} и E_{o-532} – оптическая плотность опытной пробы (после инкубации) при 450 и 532 нанометрах соответственно, в единицах оптической плотности (ОЕ);

E_{k-450} и E_{k-532} – оптическая плотность контрольной пробы при 450 и 532 нанометрах соответственно, в ОЕ;

0,5 – расчетный коэффициент.

2.6.4 Определение активности ферментов антиоксидантной системы

Оценку функционального состояния ферментных компонентов системы неспецифической защиты в эритроцитах и ротовой жидкости проводили на основании анализа активности каталазы, ферментов метаболизма глутатиона – глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза.

Определение активности каталазы в ротовой жидкости и гемолизате эритроцитов

Метод определения каталазной активности был основан на регистрации скорости утилизации пероксида водорода (H_2O_2) в реакционной смеси, в которую вносили ротовую жидкость, содержащую фермент. О скорости утилизации H_2O_2 судили по выраженности понижения экстинкции реакционной смеси (при 260 нм), на которой пероксид водорода имел максимум светопоглощения. В ходе эксперимента к 0,3 % раствору пероксида водорода объемом 2,5 мл добавляли ротовую жидкость объемом 200 мкл, реакцию осуществляли в течение 10 минут (при температуре равной 37 °C), после чего ее останавливали путем внесения 50 % раствора трихлоруксусной кислоты объемом 0,3 мл. Одновременно с опытными ставили контрольные пробы, в которые трихлоруксусную кислоту вносили до того, как добавляли ротовую жидкость. После проведения центрифугирования (10 минут при 3000 оборотах в минуту) супернатант из контрольных и опытных проб фотометрировали (длина волны 260 нм) против 5 % трихлоруксусной кислоты. Активность фермента выражали в $ммоль \cdot мин^{-1} \cdot л^{-1}$ / на 1 мг белка.

Определение активности глутатионпероксидазы в ротовой жидкости и гемолизате эритроцитов

Данный метод был основан на способности глутатионпероксидазы обеспечивать реакцию взаимодействия восстановленной формы глутатиона с гидроперекисью трет-бутила. При этом активность энзима оценивали по изменению концентрации восстановленной формы глутатиона в двух пробах (одна проба была до инкубации с модельным субстратом, вторая исследовалась

после проведения инкубации) за счет цветной реакции с 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислотой. При выполнении описанной реакции 0,2 мл ротовой жидкости или 200 мкл разбавленного в 200 раз гемолизата эритроцитов добавляют в 0,73 мл сложного буфера. Полученную смесь инкубируют при 37 °С в течение 10 минут. Далее реакцию инициировали путем внесения в реакционную систему 0,14 % раствора гидроперекиси трет-бутила объемом 70 мкл; спустя 5 минут инкубации (при температуре равной 37 °С) реакцию останавливали за счет внесения 20 % раствора трихлоруксусной кислоты в объеме 0,2 мл. При этом раствор гидроперекиси трет-бутила в контрольные пробы вносили только после осаждения в них белка трихлоруксусной кислотой. Затем указанные пробы центрифугировали при 3 000 оборотах в минуту (в течение 10 минут). В супернатанте определяли количество восстановленного глутатиона путем добавления к 0,1 мл трис-НСl буфера (рН = 8,5) объемом 2,65 мл, содержащего ЭДТА (0,01 %) и метаноловый раствор 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты объемом 25 мкл. Далее перемешивали пробы и фотометрировали (длина волны составляла 412 нм) в кювете против дистиллированной воды. Расчет активности глутатион-пероксидазы в ротовой жидкости производили путем учета изменений содержания восстановленной формы глутатиона в этих пробах до и после их инкубации с гидроперекисью трет-бутила. Ферментативную активность выражали в микромоль в минуту на 1 миллиграмм белка (мкмоль/мин на 1 мг белка) [10].

Определение активности глутатионредуктазы в ротовой жидкости и гемолизате эритроцитов

Активность глутатионредуктазы определяли по способу, основанному на регистрации убыли НАДФН в ходе восстановления окисленной формы глутатиона (рисунок 2.7). Использовали гемолизат эритроцитов, приготовленный путем разбавления эритроцитарной взвеси холодной дистиллированной водой в 10 раз, и ротовую жидкость. В ходе выполнения методики 0,05 мл биожидкости добавляли к 1,8 мл 0,1 М натрий-калий фосфатному буферному раствору с рН = 7,0. К реакционной смеси добавляли по 0,1 мл 1,2 % раствора окисленного глутатиона и 0,15 % раствора НАДФН. Убыль НАДФН регистрировали в УФ-области спектра света при 340 нм в течение 3-х минут. Активность выражали в ммоль/(л*мин).

2.7 Исследование содержания в плазме крови и в ротовой жидкости паратгормон-родственного протеина

Пробы крови и ротовой жидкости собирали в пробирки вакуумные стеклянные BD Vacutainer с крышкой BD Hemogard с K_3 ЭДТА и аprotинином (Кат. номер REF 361017, Бектон Дикинсон энд Компани, США). Полученную кровь центрифугировали при 3000 об/мин. в течение 15-ти минут, отбирали плазму крови, которую хранили не более 1 месяца при -80 градусах С. Таким же образом сохраняли образцы ротовой жидкости. Определение концентрации ПТГрП человека в сыворотке крови и ротовой жидкости выполняли методом ИФА с использованием набора реагентов PTHrP Elise kit (кат. номер E01P0574, BlueGene Biotech, Китай).

Набор основан на методе конкурентного ИФА с использованием антител против ПТГрП и конъюгата ПТГрП-HRP. Образец для анализа и буфер инкубировали вместе с конъюгатом в течение часа, после чего выполняли 5-ти кратную процедуру промывки лунок планшета. Затем вносили в лунки субстрат для фермента HRP, образовывался продукт реакции фермент-субстрат синего цвета. Для остановки реакции добавляли стоп-раствор в результате чего реакционная среда окрашивалась в желтый цвет. Интенсивность окраски измеряли с использованием мультимодального планшетного ридера FluostarOmega (BMG, Германия) при 450 нм. Интенсивность окраски была обратно пропорциональна концентрации ПТГрП, так как ПТГрП в биологических образцах и конъюгат ПТГрП-HRP конкурировали за сайт связывания антител против ПТГрП. Поскольку количество таких сайтов ограничено, чем больше их занято ПТГрП из биообразца, тем меньше их остается для связывания конъюгата ПТГрП-HRP. Определение концентрации выполняли с помощью калибровочной кривой, построенной параллельно основному тесту на основе тестирования стандартных образцов с известной концентрацией.

2.8 Статистические методы исследования

Для выполнения статистической обработки результатов исследования использовали AnalystSoft Inc., StatPlus – программа статистического анализа. Версия 7. См. www.analystsoft.com/ru/. Для построения графиков использовали программу Excel (Microsoft). Для проверки нормальности распределения выборок с учетом размера выборок был выбран критерий Шапиро-Уилка. В большинстве случаев нулевая гипотеза об отсутствии отличий распределения от нормального была отклонена. В этой связи, полученные нами количественные показатели, представили в диссертационной работе в виде медианы (Me) и процентилей (P25 и P75). Для сравнения показателей использовали критерий Краскела-Уоллиса, являющийся непараметрическим аналогом однофакторного дисперсионного анализа. Различия показателей при сравнении выборок считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$. При условии обнаружения статистически значимых различий между группами в целом проводили попарные сравнения. Для этого был использован критерий Манна-Уитни с поправкой на число попарных сравнений.

Корреляцию между исследуемыми показателями в сыворотке и ротовой жидкости у пациентов с РМЖ оценивали с использованием коэффициентов корреляции Пирсона. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми. Для визуального контроля и исключения выбросов дополнительно проводилось построение диаграмм рассеяния. Сила корреляционных взаимоотношений признаков анализировалась с помощью коэффициента корреляции (r): при $|r| \leq 0,25$ корреляция признавалась слабой, при $0,25 < |r| < 0,75$ – умеренной, при $|r| \geq 0,75$ – сильной. Если r принимал значения меньше 0, то корреляция считалась отрицательной, если r имел значение больше 0 – положительной, $r = 0$ свидетельствовал об отсутствии корреляции. Для оценки диагностической значимости лабораторных тестов использовали ROC-анализ. Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

ГЛАВА 3

ОСОБЕННОСТИ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЙ КАРТИНЫ И ИЗМЕНЕНИЙ ОНКОМАРКЕРОВ В КРОВИ И РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Диагностический процесс, сопровождающий клиническое ведение больных раком молочной железы, традиционно характеризуется выполнением большого количества инструментальных исследований и определением многих лабораторных маркеров. Клинико-лабораторные исследования в этом случае преследуют несколько целей: оценить степень тяжести текущего состояния больного, определение онкомаркеров часто позволяет дополнительно оценить прогноз и эффективность терапии. Изменения стандартных общеклинических лабораторных маркеров, характеризующих обмен белков, липидов и углеводов, ферменты и электролиты – достаточно хорошо известны и не представляют какого-то специального интереса. Тем не менее, не до конца ясна лабораторная картина изменений в ротовой жидкости, как и связи таких изменений в крови. Поэтому в данной главе представлены патобиохимические изменения в крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы, а также проанализированы корреляционные взаимосвязи между аналогичными маркерами двух биологических жидкостей.

3.1 Изменения лабораторных биохимических показателей в крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы

В крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы были определены следующие лабораторные показатели: общий билирубин, общий белок, мочеви́на, креатинин, глюкоза, общий холестерин, общий кальций, железо,

калий, натрий, хлориды, ЛДГ, АСТ, АЛТ, щелочная фосфатаза, альфа-амилаза и С-реактивный белок.

Определение маркеров белкового обмена в сыворотке крови и ротовой жидкости больных РМЖ продемонстрировало проактически полное соответствие нормальным значениям аналогичных показателей, характерных для контрольной группы (таблица 5).

Таблица 5 – Значения лабораторных маркеров белкового обмена в сыворотке крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы ($Me(p_{0,25}/p_{0,75})$)

Группа, биожи́дкость	Лабораторные показатели			
	Общий белок, г/л	Мочевина, ммоль/л	Креатинин, мкмоль/л	Билирубин общий, мкмоль/л
Контрольная, СК	73,4 (68,4/76,0)	4,2 (3,5/5,2)	80,1 (73,5/84,5)	5,7 (4,7/6,8)
Контрольная, РЖ	1,5 (1,3/2,5)	2,0 (1,5/2,3)	8,6 (7,7/9,4)	0,3 (0,2/0,4)
Опытная, СК	72,7 (68,1/79,2)	5,4 (3,7/5,9)	73,9 (67,0/81,0)	7,8 (6,3/9,1)
Опытная, РЖ	2,0 (1,8/3,0)	3,1* (2,5/4,0)	9,3 (8,4/11,8)	0,3 (0,2/0,5)
Примечание – * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением аналогичного маркера контрольной группы. Сокращения: СК – сыворотка крови, РЖ – ротовая жидкость.				

Так концентрации общего белка, креатинина и общего билирубина в крови или ротовой жидкости больных основной группы статически значимо не отличались от контрольного уровня. Только содержание мочевины в смешанной слюне пациенток с РМЖ было на 55 % выше в сравнение со значением показателя группы здоровых женщин. На наш взгляд это имеет ограниченное диагностическое значение в условии общей лабораторной картины, а также на фоне широкой вариабельности лабораторных маркеров смешанной слюны, которые изменяются вследствие влияния целого ряда внутренних сигналов и внешних факторов. К последним можно отнести особенности питания и питьевого рациона, курение, чистку зубов, использование прочих гигиенических средств и даже ответственное отношение к

процедуре сбора материала. Тем не менее, общий перечень лабораторных маркеров слюны включал еще целый ряд показателей, поэтому мы считаем необходимым учитывать полную лабораторную картину.

Интегральная оценка окислительного стресса может быть рассчитана на основе стандартных биохимических исследований. Chen L. и соавторами предложен коэффициент [61], основанный на измерении концентрации альбумина, прямого билирубина и мочевины в крови (3):

$$\text{BCIOSS} = 0,074 \times \text{ЧСА} - 0,094 \times \text{ПБил} - 0,099 \times \text{Моч}, \quad (3)$$

где BCIOSS – breast cancer integrated oxidative stress score;

ЧСА – концентрации альбумина, г/л;

ПБил – концентрация прямого альбумина, мкмоль/л;

Моч – концентрация мочевины, ммоль/л.

На основе данного уравнения был оценен уровень окислительного стресса и в настоящем исследовании. Для здоровых пациентов контрольной группы коэффициент составил 2,88, для больных основной группы – 2,28. Согласно данным Chen L. и соавт., которые провели регрессионный анализ по фактору выживаемости пациентов с раком молочной железы, пациенты с уровнем $\text{BCIOSS} \leq 2,54$ могут быть отнесены к группе с низким уровнем интегративного показателя и худшими показателями 5-ти летней выживаемости [61]. Таким образом, в настоящем исследовании средний уровень BCIOSS пациентов соответствует неблагоприятному прогнозу. Аналогичный коэффициент для ротовой жидкости представляет интерес, однако простой экстраполяции данных на слюну недостаточно ввиду разных соотношений маркеров на системном и местном уровне и разной корреляции лабораторных показателей.

Оценка состояния углеводного и липидного обмена включала определение глюкозы и общего холестерина в сыворотке крови и ротовой жидкости (таблица 6). Изменений содержания глюкозы в биологических жидкостях больных РМЖ выявлено не было. Концентрация общего холестерина в сыворотке крови больных основной группы была увеличена на 23 % относительно контрольной группы. В

ротовой жидкости женщин с РМЖ уровень анализируемого метаболита липидного обмена соответствовал уровню, определенному у практически здоровых женщин контрольной группы. Более детальный анализ нарушений липидного и углеводного обмена считали нецелесообразным ввиду отсутствия изменений ключевых маркеров и второстепенного участия данных патобиохимических механизмов в патогенезе РМЖ.

Таблица 6 – Значения лабораторных маркеров углеводного и липидного обмена в сыворотке крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы (Me(p_{0,25}/p_{0,75}))

Группа, биожидкость	Лабораторные показатели	
	Глюкоза, ммоль/л	Общий холестерин, ммоль/л
Контрольная, СК	4,93 (4,56/5,45)	4,35 (4,17/4,64)
Контрольная, РЖ	0,14 (0,06/0,45)	0,06 (0,03/0,15)
Опытная, СК	5,61 (4,98/6,22)	5,35 (4,86/6,12)*
Опытная, РЖ	0,18 (0,05/1,17)	0,06 (0,03/0,14)
Примечание – * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением аналогичного маркера контрольной группы. Сокращения: СК – сыворотка крови, РЖ – ротовая жидкость.		

С учетом лабораторного анализа ротовой жидкости отдельное внимание было уделено изменениям минерального обмена, играющего исключительную роль в функционировании слюны и ротовой полости. В сыворотке крови и смешанной слюне были определены концентрации ионов кальция, железа, калия, натрия и хлорид-анионов (таблица 7). В результате проведенных исследований в сыворотке крови больных РМЖ не было выявлено каких-либо изменений относительно контрольной группы практически здоровых женщин. Это было вполне ожидаемо ввиду высокой стабильности в крови вышеперечисленных электролитов, которые можно рассматривать как биохимические константы, жестко поддерживаемые гомеостатическими механизмами в пределах заданной нормы. Единственной тенденцией ($p = 0,0603$) было несколько сниженное на 31 %

значение концентрации сывороточного железа в крови больных РМЖ. Определение минерального состава ротовой жидкости оказалось более информативным и продемонстрировало увеличенное значение концентраций ионов железа и калия. В смешанной слюне женщин с РМЖ содержание железа было увеличенным на 33 % , а калия – на 17 % в сравнении с аналогичными показателями контрольной группы. Остальные показатели находились в пределах нормальных значений, выявленных у практически здоровых женщин. Такой характер изменений свидетельствует о деструктивных процессах в ротовой полости с высвобождением содержимого из разрушенных клеток в слюну.

Таблица 7 – Значения лабораторных маркеров электролитного обмена в сыворотке крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы (Me(p_{0,25}/p_{0,75}))

Группа, биожи́дкость	Лабораторные показатели				
	Са общий, ммоль/л	Fe, мгмоль/л	К, ммоль/л	Na, ммоль/л	Cl, ммоль/л
Контрольная, СК	2,41 (2,35/2,48)	18,3 (13,3/22,8)	4,56 (3,28/4,80)	141,4 (137,0/143,4)	101,3 (99,8/102,7)
Контрольная, РЖ	1,83 (1,12/2,35)	2,4 (1,6/3,5)	4,23 (3,91/5,78)	15,3 (11,0/19,5)	20,3 (18,3/23,8)
Опытная, СК	2,38 (2,35/2,46)	12,6 (6,8/19,6)	4,35 (3,88/4,73)	139,0 (137,0/141,0)	102,5 (102,0/104,0)
Опытная, РЖ	2,10 (0,86/2,35)	3,2* (1,9/8,6)	4,93* (4,22/13,50)	17,0 (10,0/20,3)	21,0 (18,8/24,3)
Примечание – * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением аналогичного маркера контрольной группы. Сокращения: СК – сыворотка крови, РЖ – ротовая жидкость.					

Наиболее интересные данные были получены в ходе определения активности ферментов в сыворотке крови и ротовой жидкости больных РМЖ (таблица 8). В крови больных основной группы были определены увеличенные значения активности ЛДГ и альфа-амилазы. Активность ЛДГ была увеличена на 69 % в сравнении с контрольной группой, активность альфа-амилазы – на 65 % . В ротовой жидкости больных РМЖ были определены увеличенные значения

активности всех изученных ферментов относительно контрольной группы. Активность ЛДГ была увеличена даже в большей степени, чем в крови – в 2,2 раза. Активность аминотрансфераз – АЛТ и АСТ была увеличена в 2,2–2,3 раза, активность ЩФ – в 4,7 раза. Таким образом, оценка ферментативной активности, в основном ферментов-маркеров цитолитического синдрома, показала наличие более выраженных изменений и потенциально более высокой диагностической ценности ротовой жидкости.

Таблица 8 – Значения активности ферментов в сыворотке крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы ($Me(p_{0,25}/p_{0,75})$)

Группа, биожидкость	Лабораторные показатели				
	ЛДГ, ед/л	АЛТ, ед/л	АСТ, ед/л	ЩФ, ед/л	α -амилаза, ед/л
Контрольная, СК	132,1 (88,5/156,0)	21,4 (17,5/24,6)	22,7 (18,5/26,0)	73,5 (55,2/101,4)	47,4 (35,4/70,6)
Контрольная, РЖ	88,5 (67,5/134,7)	7,4 (4,5/9,5)	6,5 (3,8/8,0)	17,6 (9,5/31,2)	–
Опытная, СК	222,7* (197,2/236,6)	19,5 (16,8/30,3)	23,0 (17,8/35,5)	94,0 (65,7/113,9)	78,3* (64,8/86,7)
Опытная, РЖ	190,7* (139,5/241,5)	16,5* (8,0/29,3)	15,0* (8,5/21,5)	82,2* (57,2/96,7)	–
Примечание – * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением аналогичного маркера контрольной группы. Сокращения: СК – сыворотка крови, РЖ – ротовая жидкость.					

Наглядно зафиксировать изменения ферментов сыворотки крови больных основной группы можно сравнением коэффициента соотношения их значений с контрольной группой. Так, для ЛДГ соотношение активности в крови и слюне в контрольной группе составило 1,5 единицы, для АЛТ и АСТ – 2,9 и 3,5 соответственно, для ЩФ – 4,2. В основной группе пациенток соотношение активности ЛДГ на системном и местном уровнях составило 1,2 единицы, АЛТ – 1,2, АСТ – 1,5, ЩФ – 1,1. Таким образом, наглядно прослеживается преобладание изменений в смешанной слюне над системными перестройками в крови.

С учетом выявленных изменений ферментов цитолитического синдрома и в сыворотке крови, и в смешанной слюне, был проведен анализ корреляционных взаимосвязей показателей между этими двумя биологическими жидкостями. В результате в основной группе женщин с РМЖ было установлено наличие положительной корреляции умеренной силы ($r = 0,6058$, $p < 0,001$) для активности ЛДГ и корреляции слабой силы ($r = 0,2430$, $p = 0,0245$) для активности ЩФ. Остальные ферменты не продемонстрировали наличия взаимосвязи активности в двух изученных биожидкостях, поэтому механизм повышения активности аминотрансфераз в слюне остается неясным.

ЛДГ, аминотрансферазы и ЩФ не являются специфическими маркерами онкопатологии, однако анализ активности ферментов-маркеров цитолиза в крови больных РМЖ имеет цель оценки общей тяжести патологического процесса, состояния внутренних органов и прогнозирования дальнейшего прогрессирования болезни и эндогенной интоксикации. Для этих целей, а также для оценки степени злокачественности опухолей, предложено определять целый ряд биохимических маркеров, ни один из которых не является идеальным: карциноэмбриональный антиген, ГГТ, СОД, ЩФ, глутатион, фосфогексоизомераза, лейцинаминопептидаза и холинэстераза. Преимуществом использования ЛДГ является простота и дешевизна определения. Быстрое увеличение числа злокачественных клеток модулирует уровень ЛДГ в цитоплазматическом компартменте клеток вследствие увеличения экспрессии ее генов. Высокий уровень экспрессии ЛДГ необходим опухолевым клеткам для усиления протекания анаэробного гликолиза. Это приводит к повышению уровня сывороточного ЛДГ у пациентов с РМЖ. Так как высокий уровень ЛДГ в сыворотке у пациентов с РМЖ указывает на плохой прогноз, хирургический результат или запущенные метастазы, то мониторинг уровня ЛДГ в сыворотке может использоваться в качестве прогностического индикатора результата терапии. Устойчиво высокий уровень ЛДГ в сыворотке или внезапное повышение уровня ЛДГ в сыворотке после операции в течение шести месяцев или в течение длительного периода может указывать на плохой результат или метастазы.

Определение концентрации С-реактивного белка в сыворотке крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы, как и в случае многих других маркеров показало значения, соответствующие контрольным цифрам. В крови значение данного маркера составляло 3,92 (2,10/4,94) мг/л, в смешанной слюне уровень белка острой фазы воспаления составил 0,25 (0,12/0,72) мг/л. Кореляционный анализ не выявил существенной взаимосвязи концентрации С-реактивного белка в двух исследуемых биологических жидкостях.

3.2 Изменения онкомаркеров в крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы

В крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы были определены следующие онкомаркеры: РЭА (раковый эмбриональный антиген), СА125 (карбогидрат-антиген-125-онкомаркер яичников, СА15-3 (карбогидрат-антиген-15-3-онкомаркер молочной железы) и ПТГрП (паратгормон-родственный протеин).

Оценка изменений сывороточного уровня вышеперечисленных онкомаркеров показала слабо выраженную тенденцию к увеличению их концентрации, что ограничивает их диагностическую ценность (таблица 9). Так концентрация РЭА в крови больных раком молочной железы была увеличена на 47 % относительно контрольной группы, содержание СА125 было выше контрольного уровня на 58 % , а СА15-3 – на 39 % . Определение аналогичных биомаркеров в ротовой жидкости также показало увеличенные их значения. Уровень онкомаркеров РЭА и СА125 в смешанной слюне больных раком молочной железы статистически значимо превышал значения соответствующих лабораторных показателей контрольной группы на 40 % и 91 % . Для СА15-3 не было выявлено статистически значимых различий при сравнении со значением показателя группы здоровых испытуемых лиц. Значимой корреляции между

уровнем РЭА, СА125 или СА15-3 в сыворотке крови и ротовой жидкости выявлено не было, что при высоком уровне этих маркеров в слюне существенно ограничивает их диагностическое значение.

Таблица 9 – Значения некоторых онкомаркеров в сыворотке крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы ($Me(p_{0,25}/p_{0,75})$)

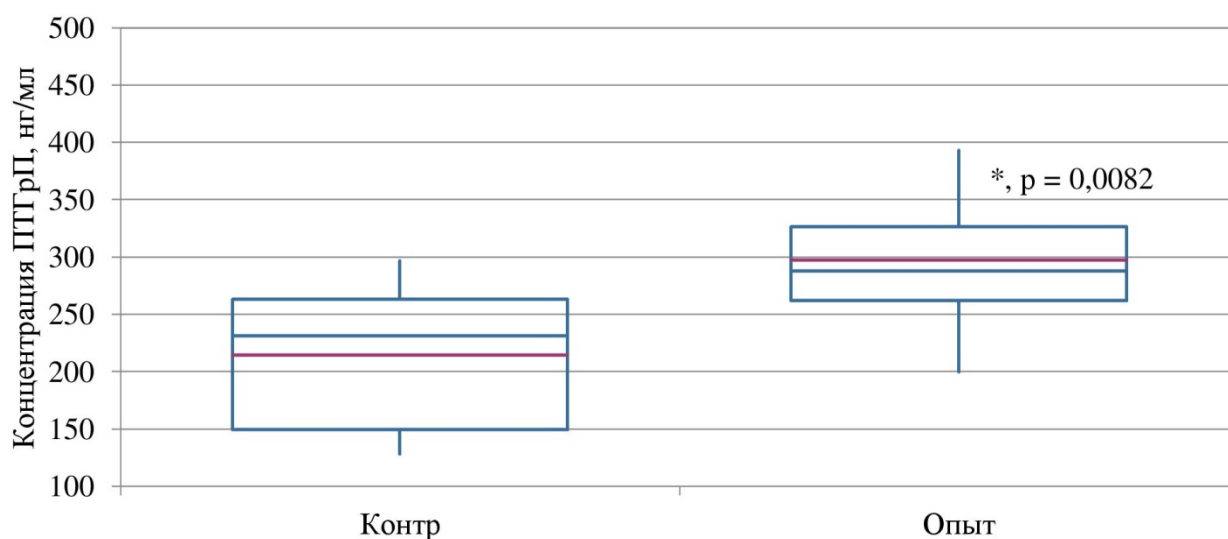
Группа, биожидкость	Онкомаркеры		
	РЭА, нг/мл	СА125, ед/мл	СА15-3, ед/мл
Контрольная, СК	3,0 (1,5/3,8)	14,8 (7,5/18,9)	12,3 (8,3/15,4)
Контрольная, РЖ	0,5 (0,3/0,6)	1,1 (0,6/1,5)	0,4 (0,2/0,6)
Опытная, СК	4,4 (2,7/5,8)*	23,4 (14,4/27,8)*	17,1 (11,4/24,9)*
Опытная, РЖ	0,7 (0,6/0,8)*	2,1 (1,4/3,0)*	0,5 (0,3/0,9)
Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением аналогичного маркера контрольной группы. Сокращения: РЭА – раковый эмбриональный антиген; СК – сыворотка крови; РЖ – ротовая жидкость.			

Преобладание системных изменений и ограниченность тестирования ротовой жидкости на вышеперечисленные онкомаркеры можно продемонстрировать оценкой их соотношения в крови / слюне. Данное соотношение в контрольной группе составило 6,0 (РЭА), 13,5 (СА125) и 30,8 (СА15-3). В основной группе аналогичные характеристики составили 6,3 (РЭА), 11,1 (СА125) и 34,2 (СА15-3).

Полученные данные согласуются с общепринятыми представлениями, широко обсуждаемыми в литературе. Так известно, что только 36–70 % случаев рака молочной железы имеют повышенный уровень РЭА в сыворотке крови. Разные исследователи расходятся в оценке прогностической значимости этого онкомаркера при распространенном раке молочной железы [187]. Имеет перспективу совместное определение нескольких показателей при раке молочной железы на ранней стадии, в частности показано повышение диагностической значимости параллельного определения сывороточного уровня α -гидроксibuтиратдегидрогеназы, РЭА и СА125. Однако такой подход также имеет ограничения по интерпретации

увеличенного количества данных и роста стоимости диагностики. Поэтому поиск новых более информативных онкомаркеров является актуальной задачей современной медицины и настоящего исследования.

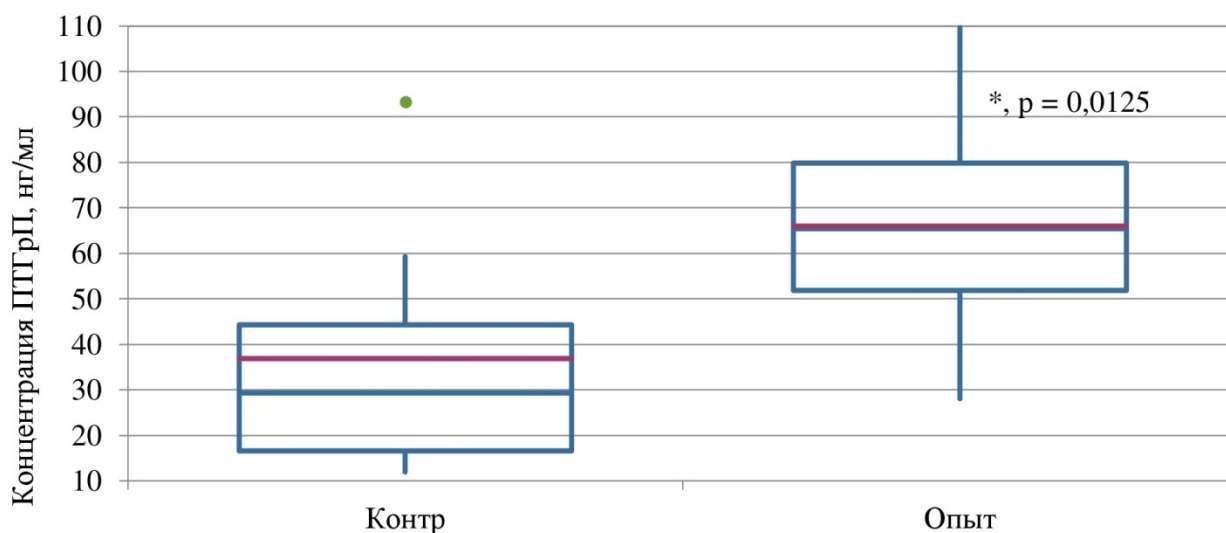
Одним из наиболее перспективных направлений поиска новых онкомаркеров является анализ диагностической ценности паратгормон-родственного протеина (ПТГрП), в том числе при определении его концентрации в смешанной слюне. Определение концентрации ПТГрП в сыворотке крови продемонстрировало отчетливую тенденцию к его росту у больных раком молочной железы относительно здоровых испытуемых лиц (рисунок 2). В опытной группе больных уровень анализируемого маркера был на 25 % выше, чем в контрольной ($p = 0,0082$). Определение аналогичного маркера в ротовой жидкости также показало увеличенные его значения в 2,2 раза относительно контроля ($p = 0,0125$) (рисунок 3).



* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением аналогичного маркера контрольной группы.

Рисунок 2 – Концентрация паратгормон-родственного протеина в сыворотке крови больных раком молочной железы ($Me(p_{0,25}/p_{0,75})$)

Оценка уровня взаимосвязи между концентрацией ПТГрП в крови и ротовой жидкости у здоровых испытуемых лиц показала наличие положительной корреляционной связи, коэффициент корреляции Пирсона составил 0,8011 ($p = 0,0303$). В опытной группе коэффициент корреляции Спирмена



* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением аналогичного маркера контрольной группы.

Рисунок 3 – Концентрация паратгормон-родственного протеина в ротовой жидкости крови больных раком молочной железы ($Me(p_{0,25}/p_{0,75})$)

составлял 0,53 ($p = 0,0019$). Таким образом, оценка уровня ПТГрП при раке молочной железы в смешанной слюне имеет преимущества перед определением традиционных онкомаркеров, таких как РЭА, СА125 и СА15-3. Соотношение содержания ПТГрП на системном и местном уровнях в контрольной группе составило 7,9. Для основной группы больных этот коэффициент составил 4,4, что наглядно демонстрирует возрастание роли смешанной слюны в определении данного биомаркера при злокачественных новообразованиях молочной железы.

3.3 Молекулярно-генетические и биохимические исследования родственников больных раком молочной железы

Дополнительно были проведены молекулярно-генетические исследования мутаций в генах BRCA1 и BRCA2. Оригинальность исследования заключалась в использовании не только крови, но и ротовой жидкости в качестве биоматериала. В настоящее время все больше внимания начинают уделять новым методам

персонализированного скрининга РМЖ для каждого пациента в зависимости от уровня риска. В свою очередь для определения риска развития РМЖ, особенно наследственных форм, подходит обнаружение мутаций в генах BRCA1/2. Как уже обсуждалось в обзоре литературы, наиболее изучены онкомаркерами РМЖ в слюне являются эпидермальный фактор роста, раковый антиген 15-3 и рецептор эпидермального фактора роста HER2/neu [8].

В настоящей работе нами были получены данные, свидетельствующие о наличии следующих типов мутаций у испытуемых лиц основной группы: гетерозигота BRCA1:5382insC (12 % больных), гетерозигота BRCA1:2080delA (4 %), Гетерозигота T/G (Cys61Gly) BRCA1:300T>G (8 %), BRCA1:4153delA (4 %). Таким образом, всего у 28 % больных РМЖ, включенных в исследование, были определены те или иные типы мутаций гена BRCA1 при анализе периферической крови. Лабораторные молекулярно-генетические исследования цельной смешанной слюны полностью подтвердили данные, полученные при анализе крови. Совпадение результатов анализа 2-х биологических жидкостей составило 100 %.

Исследование мутаций в подгруппе родственников BRCA-положительных пациентов показало следующее распределение результатов: BRCA1:5382insC (30 %), гетерозигота BRCA1:2080delA (30 %), Гетерозигота T/G (Cys61Gly) BRCA1:300T>G (10 %). При этом был также проведен анализ мутаций в крови и ротовой жидкости, который показал одинаковую диагностическую ценность обеих биологических жидкостей. С одной стороны, полученные результаты были вполне ожидаемы ввиду высокой специфичности и чувствительности молекулярно-генетических тестов. С другой стороны, любые аналитические лабораторные технологии не лишены погрешности и риска ошибок. Слюна имеет существенное преимущество в качестве источника ДНК, связанное с высокой стабильностью материала при хранении и транспортировке.

Проведение исследования предполагало, что испытуемые женщины группы родственников больных РМЖ можно отнести к категории практически здоровых людей, но как минимум 70 % лиц данной группы имеют высокий риск развития злокачественных новообразований молочной железы. Тем не менее, была проведена оценка биохимических показателей женщин данной подгруппы.

Биохимические исследования позволили выявить ряд особенностей лабораторной картины у родственниц больных РМЖ (таблица 10).

Таблица 10 – Значения биохимических показателей в сыворотке крови и ротовой жидкости женщин с высоким риском развития рака молочной железы (Me(p_{0,25}/p_{0,75}))

Исследуемые показатели	Женщины из группы риска (n = 25)	
	Кровь	РЖ
Общий белок, г/л	70,8 (68,0/72,7)	2,0 (1,8/2,7)
Мочевина, ммоль/л	6,3 (5,9/7,0)*	3,1 (2,8/3,2)*
Креатинин, мкмоль/л	68,6 (67,0/72,3)	6,8 (6,4/7,2)
Билирубин общий, мкмоль/л	16,3 (15,5/17,0)*	0,3 (0,2/0,4)
Глюкоза, ммоль/л	4,15 (3,93/4,80)	0,32 (0,13/0,41)
Холестерин, ммоль/л	4,88 (4,20/5,08)	0,03 (0,03/0,05)
К, ммоль/л	3,90 (3,80/4,68)	6,90 (6,10/7,75)*
Na, ммоль/л	138,5 (137,0/140,5)	17,1 (12,0/19,3)
Cl, ммоль/л	106,0 (103,3/108,8)	21,4 (17,1/23,6)
ЛДГ, ед/л	206,2 (191,1/216,9)*	70,1 (49,7/102,3)
АЛТ, ед/л	28,0 (20,3/30,8)	5,1 (3,7/6,2)
АСТ, ед/л	27,5 (23,3/29,8)	4,6 (4,4/4,7)
ЩФ, ед/л	78,9 (71,3/100,9)	11,9 (10,5/14,5)
α-амилаза, ед/л	64,2 (55,3/72,4)	–
СРБ, мг/л	2,86 (2,04/3,99)	0,67 (0,16/1,05)
РЭА, нг/мл	5,4 (5,0/5,8)*	0,7 (0,6/0,8)*
CA125, ед/мл	27,4 (19,1/30,6)*	0,8 (0,7/1,2)
CA15-3, ед/мл	20,6 (17,3/24,0)*	0,4 (0,3/0,5)
Примечание – * – статистически значимые различия (p < 0,05) при сравнении со значением аналогичного маркера контрольной группы. Данные контрольной группы представлены в разделе 3.1. Сокращения: СК – сыворотка крови, РЖ – ротовая жидкость.		

Во-первых, следует отметить, что имеет место быть усиление катаболизма белков с накоплением конечных продуктов – мочевины и билирубина. Так

концентрация мочевины в сыворотке крови была выше контрольных значений в 1,5 раза, хотя и укладывалась в референсные значения лаборатории. В ротовой жидкости также была увеличена концентрация мочевины в 1,6 раз. Коэффициент корреляции между содержанием мочевины в крови и слюне составил 0,6326 ($p = 0,0497$). Концентрация общего билирубина в сыворотке крови испытуемых женщин группы риска РМЖ была увеличена в 2,9 раза. Несмотря на соответствие референсным значениям такая картина не была характерна для основной группы больных РМЖ. Однако для обеих изученных групп в сравнении с контрольной была характерна высокая активность ЛДГ. В сыворотке крови испытуемых лиц рассматриваемой группы риска активность данного фермента на 56 % превышала контрольные значения. Наконец наиболее интересные данные были получены при анализе онкомаркеров. Так концентрация РЭА у женщин группы риска РМЖ была увеличена на 80 % в крови и на 40 % в смешанной слюне, содержание СА125 было увеличено на 85 % в крови, а сывороточный уровень СА15-3 превышал значение контрольного показателя на 67 % . Определение концентрации ПТГрП в сыворотке крови женщин группы риска показало увеличенные значения на 33 % , в ротовой жидкости – на 54 % . Такие результаты оказались даже выше, чем в группе с уже выявленным РМЖ. Отдельный анализ подгрупп, разделенных по принципу наличия или отсутствия мутация в гене BRCA, не позволил выявить статистически значимых различий вышеописанных биохимических показателей, включая онкомаркеры. Аналогичным образом не было выявлено статистически значимых различий биохимических показателей между подгруппами основной группы больных РМЖ, разделенных по принципу мутаций в гене BRCA. Вышеперечисленные мутации не оказывали влияния не только на изменения лабораторных маркеров обмена веществ и цитолитического синдрома, но и на уровень онкомаркеров в сыворотке крови и ротовой жидкости.

Таким образом, результаты, представленные в данной главе, демонстрируют диагностические возможности саливадиагностики в определении онкомаркеров и ряда биохимических показателей у больных РМЖ. В работе продемонстрирована диагностическая ценность определения ПТГрП

(превышающая информативность РЭА, СА125 и СА15-3) для лабораторного мониторинга РМЖ, причем доказана высокая информативность его определения именно в ротовой жидкости. Дополнительным результатом является демонстрация информативности определения ферментов-маркеров цитолитического синдрома в смешанной слюне женщин с РМЖ. Показано, что в слюне активность ЛДГ, ЩФ и аминотрансфераз увеличивается в большей степени, чем в крови, что может также быть ценным инструментом для лабораторного мониторинга.

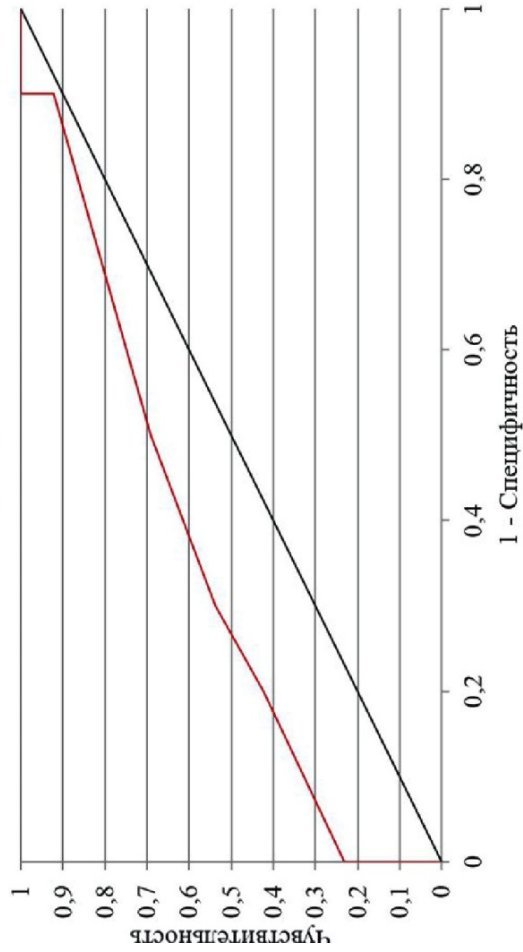
3.4 Анализ диагностической ценности биомаркеров у больных раком молочной железы и их родственников

Для оценки диагностической ценности онкомаркеров был проведен анализ ROC-кривых, включая данные, полученные в группе больных и их родственниц, которые обозначены как лица с высоким риском развития злокачественного новообразования молочной железы.

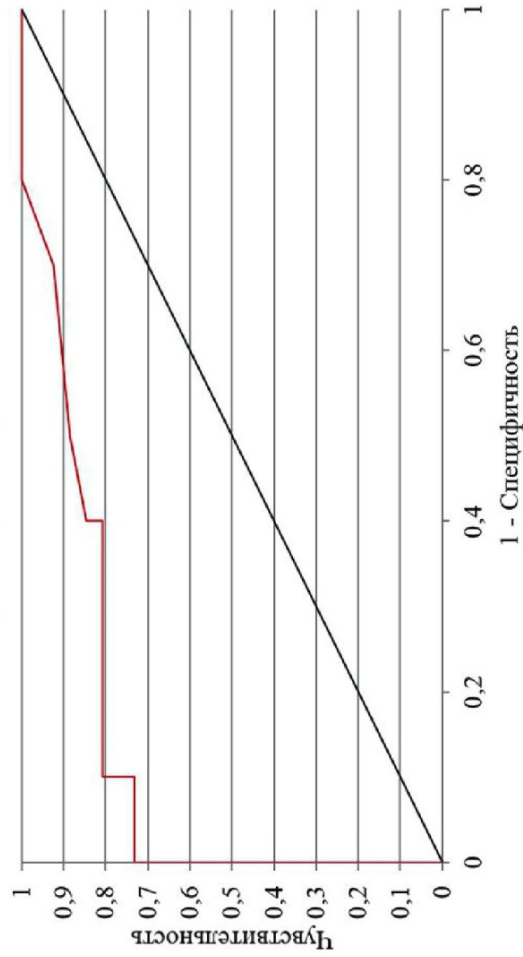
Высокая диагностическая ценность была показана для содержания всех 4-х изученных онкомаркеров в смешанной слюне и только для ПТГрП в сыворотке крови (рисунок 4). Показатель AUC для РЭА в слюне составил 0,66 (70 % специфичность и 54 % чувствительность), для СА125 – 0,88 (100 % специфичность и 73 % чувствительность), для СА15-3 – 0,69 (100 % специфичность и 46 % чувствительность).

В случае анализа ПТГрП показатель AUC в слюне составил 0,80 (75 % специфичность и 82 % чувствительность), в сыворотке крови 0,82 (88 % специфичность и 64 % чувствительность). Традиционно требованиями к диагностическим тестам на опухолевые маркеры являются исключительно высокая специфичность (> 95 %) и высокая чувствительность (> 50 %), которым неидеально, но соответствуют показатели СА 125 в слюне и ПТГрП в сыворотке крови.

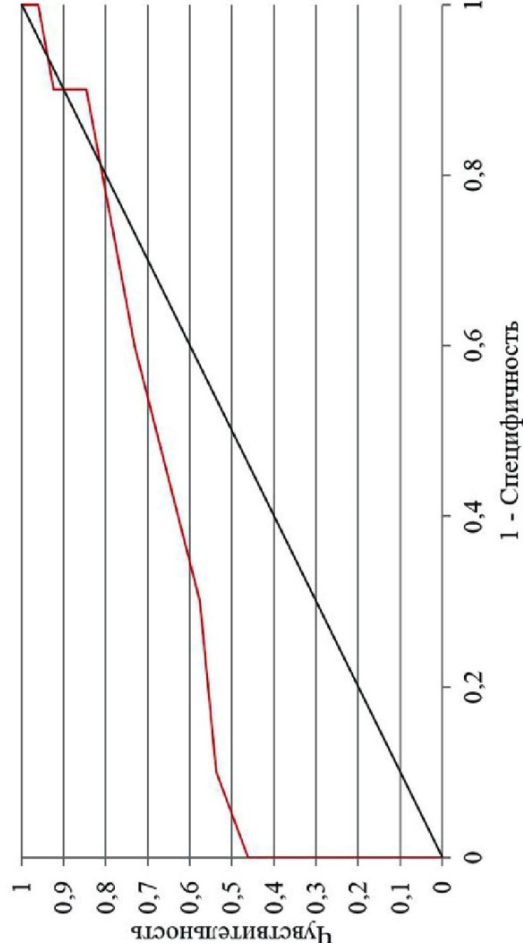
ROC-кривая (РЭА) AUC=0,660



ROC-кривая (CA125) AUC=0,879



ROC-кривая (CA15-3) AUC=0,688



ROC-кривая (ПГРП) AUC=0,803

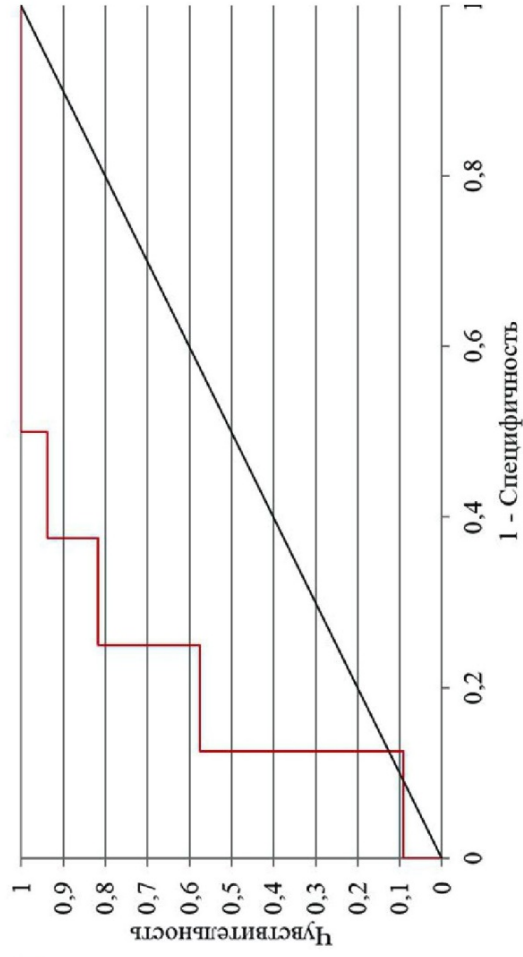


Рисунок 4 – ROC-кривые содержания онкомаркеров в ротовой жидкости испытуемых лиц подгрупп больных раком молочной железы и их здоровых родственников

ГЛАВА 4

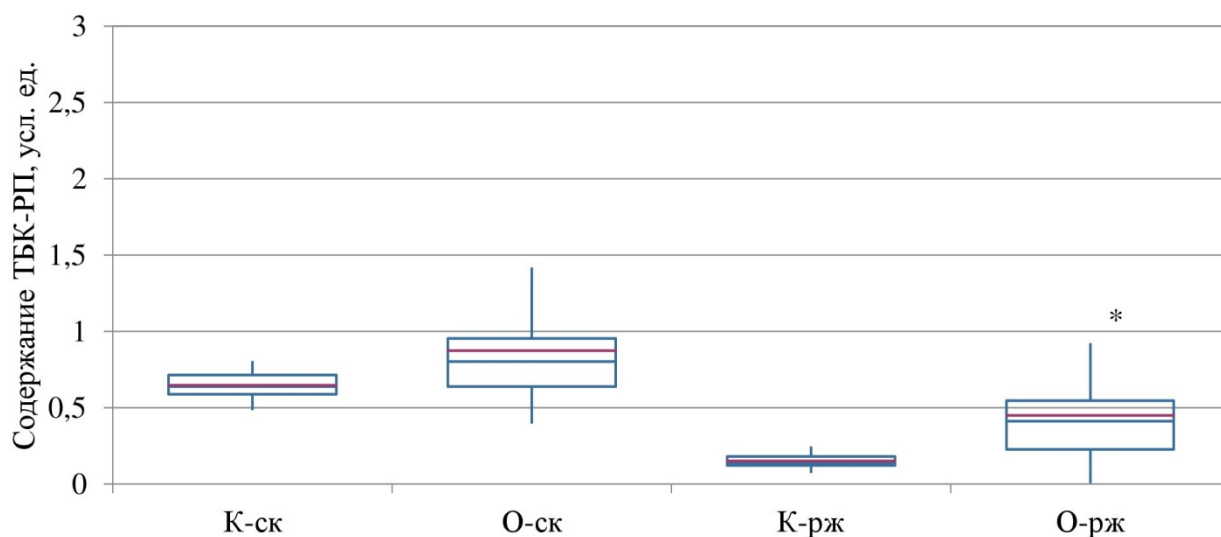
ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ БАЛАНСА ПРООКСИДАНТНО-Антиоксидантной системы крови и ротовой жидкости у больных раком молочной железы

Метаболические нарушения, развивающиеся при злокачественных новообразованиях, характеризуются дисбалансом прооксидантно-антиоксидантной системы. Маркеры окислительного стресса обладают невысокой специфичностью по отношению к типу патологического процесса, поэтому не находят применение в диагностических целях, однако широко используются для разработки технологий лабораторного мониторинга и прогнозирования. Особый интерес представляют изменения показателей интенсивности свободнорадикальных процессов и функционального состояния эндогенной системы антиоксидантной защиты в ротовой жидкости в сравнении с аналогичными маркерами крови.

4.1 Изменения маркеров окислительного стресса в крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы

В эритроцитарной взвеси и ротовой жидкости больных раком молочной железы были определены маркеры окислительного стресса: 1) концентрация ТБК-реактивных продуктов, которые можно рассматривать как продукт перекисного окисления липидов, в том числе малоновый диальдегид; 2) концентрация 8-OHdG – продукта окислительных повреждений молекулы ДНК; 3) содержание остатков битирозина – продукта оксидативных модификаций белков плазмы крови. Последний биомаркер был определен только в крови, так как в ротовой жидкости чувствительности применяемого аналитического подхода было недостаточно для надежного его определения.

Определение концентрации ТБК-реактивных продуктов показало увеличенные значения данного маркера окислительного стресса в крови больных раком молочной железы на 25 %, а в ротовой жидкости – в 2,9 раза относительно значений показателя контрольной группы (рисунок 5). При этом для показателей опытной группы, как в крови, так и в слюне была характерна широкая амплитуда изменений, перекрывающаяся, в том числе со значениями, полученными у здоровых добровольцев. Оценка взаимосвязи между содержанием ТБК-реактивных продуктов в эритроцитарной взвеси крови и ротовой жидкости подтвердила наличие статистически значимой корреляции ($r = 0,3407$, $p = 0,0430$), что усиливает диагностические возможности саливадиагностики в оценке активности перекисного окисления липидов у больных злокачественными новообразованиями молочной железы.



* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением аналогичного маркера контрольной группы. Сокращения: СК – сыворотка крови, РЖ – ротовая жидкость.

Рисунок 5 – Концентрация продуктов оксидативных модификаций биомолекул в эритроцитарной взвеси и ротовой жидкости больных раком молочной железы ($Me(p_{0,25}/p_{0,75})$)

Предполагается, что BRCA1 также участвует в регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза клеток, поэтому отдельно были проанализированы маркеры в крови и ротовой жидкости больных РМЖ с мутациями BRCA1 или без. Оценка различий содержания ТБК-реактивных продуктов показала наличие

статистически значимых различий данного маркера в крови больных основной группы, тогда как в смешанной слюне такой особенности выявлено не было. В эритроцитарной взвеси BRCA-положительных больных содержание ТБК-реактивных продуктов составило 0,93 (0,85/1,11) усл. ед., что на 46 % превышало значение аналогичного маркера больных, у которых мутаций в рассматриваемом гене выявлено не было. Полученные данные объясняют сравнительно небольшую разницу уровня продуктов липопероксидации в крови больных РМЖ и испытуемых добровольцев контрольной группы гетерогенностью основной группы. Детальный анализ с учетом молекулярно-генетических факторов в группе больных РМЖ уже позволяет получить более объективную информацию.

Определение лабораторного маркера окислительных модификаций ДНК – 8-OHdG также подтвердило развитие окислительного стресса на системном и местном уровне (таблица 11). Так в плазме крови концентрация 8-OHdG была увеличена в 1,9 раза относительно контроля ($p < 0,001$), в ротовой жидкости анализируемый показатель превышал контрольные цифры всего на 14 % ($p = 0,1412$). В плазме крови дополнительно была определена концентрация остатков битирозина (продукта окислительных повреждений белков) флуориметрическим методом, которая в группе женщин с РМЖ была статистически значимо увеличена на 17 % в сравнении с контролем.

Таблица 11 – Значения лабораторных маркеров окислительных повреждений белков и ДНК в сыворотке крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы ($Me(p_{0,25}/p_{0,75})$)

Группа, биожидкость	Лабораторные показатели	
	8-OHdG, нг/мл	Битирозин, ед.фл.*100/г белка
Контрольная, СК	23,25 (18,05/26,75)	3,6 (3,3/3,7)
Контрольная, РЖ	2,42 (2,12/2,78)	–
Опытная, СК	44,20 (37,60/57,30)*	4,2 (3,4/4,7)*
Опытная, РЖ	2,8 (2,51/4,05)*	–
Примечание – * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением аналогичного маркера контрольной группы. Сокращения: СК – сыворотка крови, РЖ – ротовая жидкость.		

Системное развитие окислительного стресса подтверждается сбалансированным нарастанием продуктов оксидативных повреждений биомолекул в крови / ротовой жидкости с преобладанием компонента, представленного в числителе. Данный коэффициент соотношения 8-OHdG на системном и местном уровнях в контрольной группе составил 9,6, тогда как в опытной 15,8. Аналогичное соотношение для ТБК-реактивных продуктов в контрольной группе составило 4,6, в основной группе больных РМЖ – 1,9.

Для оценки диагностической ценности саливадиагностики окислительного стресса также выполнили расчет корреляционных коэффициентов между показателями крови и ротовой жидкости. В контрольной группе коэффициенты корреляции между содержанием ТБК-реактивных продуктов ($r = 0,270$, $p = 0,0756$) или 8-OHdG ($r = 0,2014$, $p = 0,2305$) в крови и смешанной слюне характеризовали отсутствие статистически значимой связи двух биологических жидкостей. Это может быть обусловлено относительной независимостью метаболических систем ротовой жидкости в норме, а также случайным характером образования и накопления продуктов оксидативных модификаций биомолекул. В основной группе больных РМЖ интенсивное образование ТБК-реактивных продуктов и 8-OHdG способствовало увеличению их проникновения в жидкость полости рта, что отразилось на коэффициентах корреляции. Для ТБК-реактивных продуктов липопероксидации: $r = 0,3407$ ($p = 0,0430$), для 8-OHdG коэффициент составил $r = 0,4550$ ($p = 0,0215$), что характеризует связь умеренной силы.

Анализ концентрации продуктов окислительных модификаций белков в крови больных основной группы не подтвердил наличие различий у BRCA-положительных пациентов и больных без выявленных мутаций этого гена. Определение в аналогичных подгруппах содержания продукта оксидативных повреждений ДНК продемонстрировало наличие различий в крови, но не в ротовой жидкости. Концентрация 8-OHdG в крови BRCA-положительных пациенток составила 51,7 (44,8/57,3) нг/мл и была на 38 % выше, чем в подгруппе больных РМЖ без мутаций в гене BRCA1.

Таким образом, изменения маркеров оксидативных модификаций биомолекул в крови и ротовой жидкости демонстрируют развитие

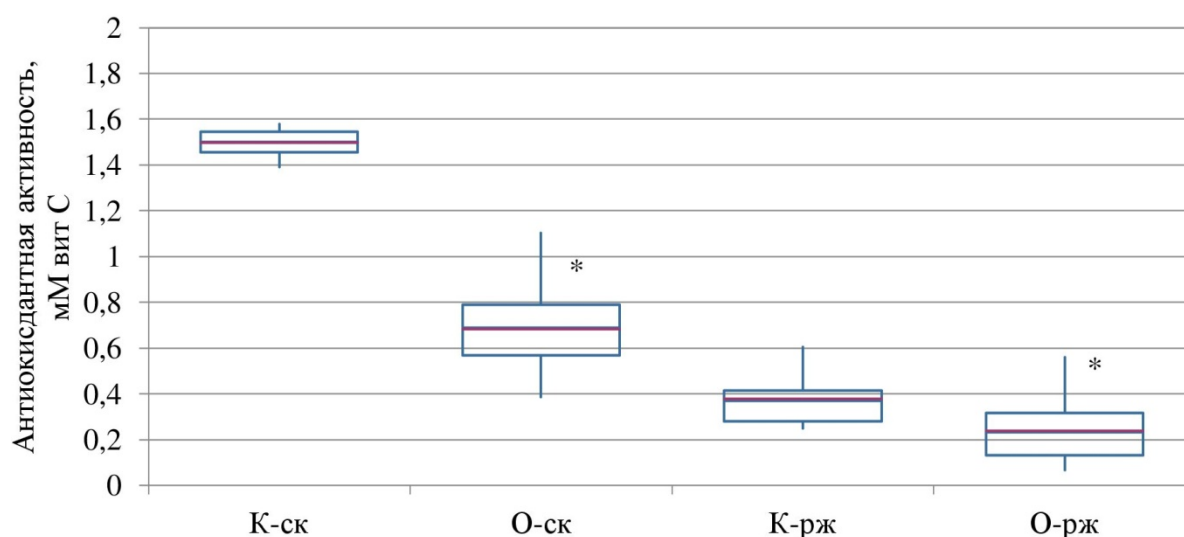
окислительного стресса на системном и местном уровнях у больных РМЖ. Подтверждено, что мутации в гене BRCA1 оказывает одно из ведущих влияний на развитие и выраженность окислительного стресса у больных РМЖ. Сравнительный анализ маркеров двух используемых биологических жидкостей продемонстрировал потенциальную возможность замены плазмы крови смешанной слюной для диагностики состояния прооксидантных факторов на системном уровне.

4.2 Изменения функционального состояния эндогенной системы антиоксидантной защиты в крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы

В эритроцитарной взвеси больных раком молочной железы были определены маркеры функционального состояния эндогенной системы антиоксидантной защиты: концентрация восстановленного глутатиона, активность глутатионпероксидазы и каталазы. В плазме крови тех же больных была определена общая антиоксидантная активность и суммарное содержание тиоловых групп. В ротовой жидкости больных раком молочной железы был определен практически тот же набор маркеров, что и в крови, за исключением содержания тиоловых групп.

Оценка общей антиоксидантной активности, определяемой железом-восстанавливающим способом, показала сниженные ее значения в биологических жидкостях больных РМЖ (рисунок 6). В сыворотке крови женщин основной группы данный показатель был снижен в 2,2 раза, в ротовой жидкости – на 61 % при сравнении с контрольными значениями соответствующих показателей. В лабораторной диагностике определенный интерес представляют расчетные интегральные показатели или коэффициенты. Для оценки функционального состояния антиоксидантной системы можно рассчитывать отношение железом-

восстанавливающей способности сыворотки крови (системный уровень) и смешанной слюны (локальный уровень). Нормальный баланс антиоксидантной активности характеризуется коэффициентом 4,1, для больных РМЖ коэффициент составил 3,0. Это свидетельствует не только об окислительном стрессе, но также о преимущественном снижении антиоксидантного потенциала на системном уровне – в крови, что в целом соответствует характеру соматической патологии. Данное отношение можно использовать в частности для прогнозирования локальных осложнений основного заболевания, патобиохимически связанных с развитием окислительного стресса.

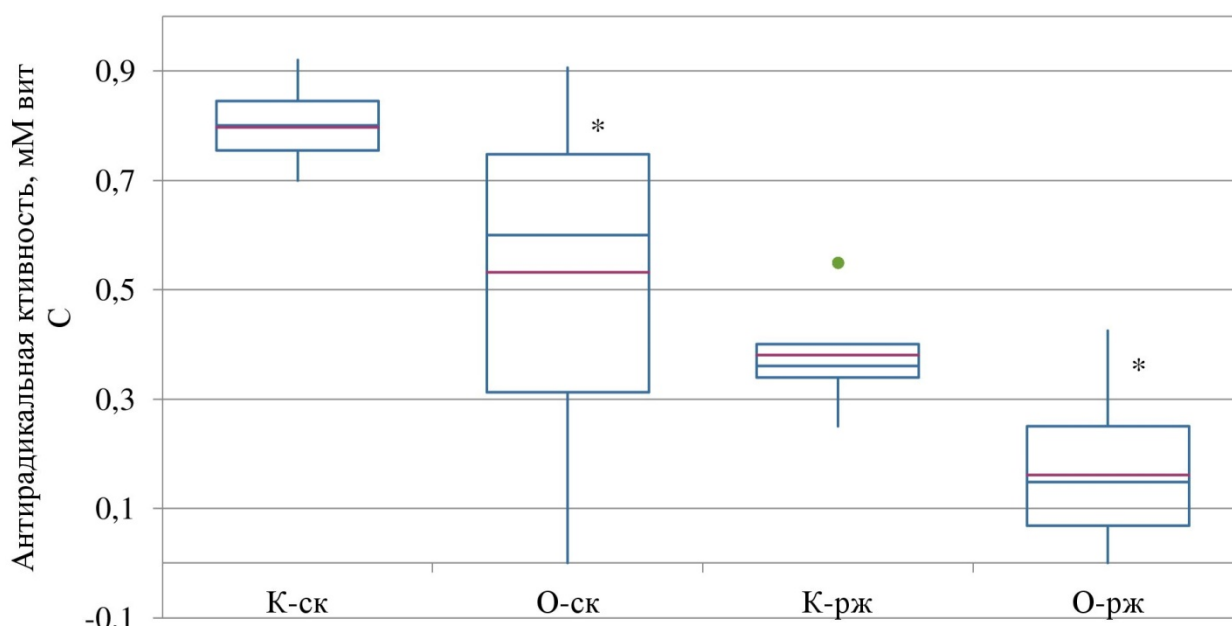


* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением аналогичного маркера контрольной группы. Сокращения: СК – сыворотка крови, РЖ – ротовая жидкость.

Рисунок 6 – Железо-восстанавливающая активность плазмы крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы ($Me(p_{0,25}/p_{0,75})$)

Альтернативой, дополняющей железо-восстанавливающую активность биологических жидкостей, является антирадикальная способность, тестируемая *in vitro* в модели сорбции катионного радикала ABTS. Результаты представлены на рисунке 7. Определение данного показателя также показало сниженные значения в крови и ротовой жидкости. Так на системном уровне антирадикальная способность сыворотки крови больных РМЖ была снижена на 25 %, а на локальном уровне – в ротовой жидкости – в 2,4 раза. Общие тенденции были аналогичны изменению железо-восстанавливающей способности, однако коэффициенты соотношения

системного и локального значения данного параметра существенно отличались. Для анализируемого параметра коэффициент данного соотношения в контрольной группе составил 2,2, а основной группе – 4,1, что сигнализирует о негативных перестройках на местном уровне и большой вовлеченности ротовой полости в патогенез окислительного стресса при РМЖ. С учетом разного характера изменений двух параметров антиоксидантной активности, мы полагаем необходимым в первую очередь учитывать общую направленность патологического процесса. В данном случае снижение антиоксидантного потенциала и крови и смешанной слюны играет ключевое значение.



* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением аналогичного маркера контрольной группы. Сокращения: СК – сыворотка крови, РЖ – ротовая жидкость.

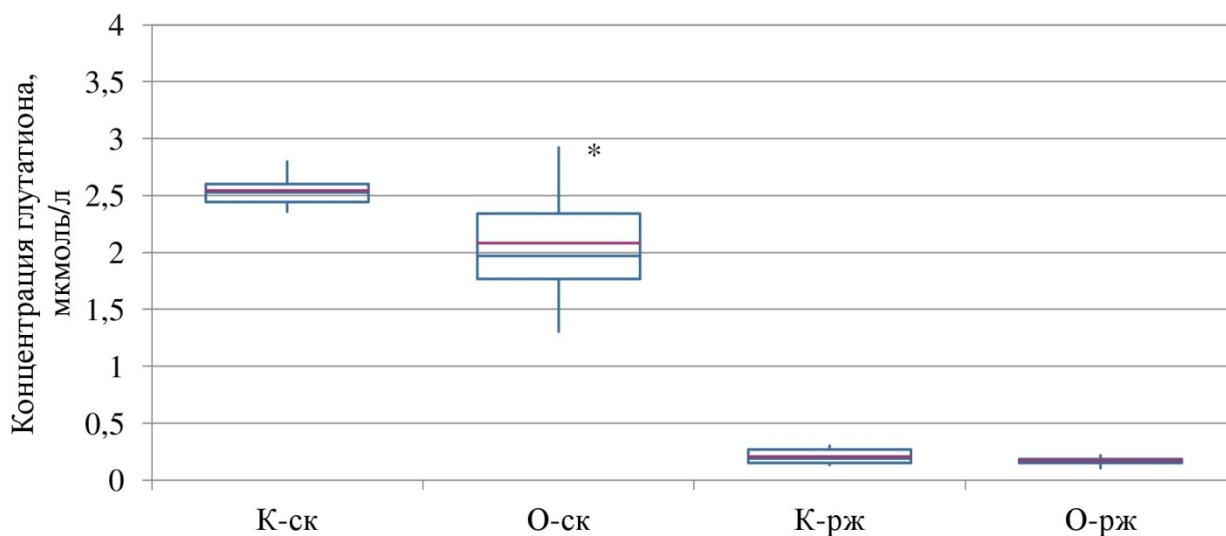
Рисунок 7 – Способность радикальной сорбции плазмы крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы ($Me(p_{0,25}/p_{0,75})$)

Определение железо-восстанавливающей способности плазмы крови больных РМЖ не продемонстрировало какого-то значимого влияния наличия мутаций в гене BRCA. Как в крови, так и в ротовой жидкости обеих подгрупп основной группы статистически значимых различий значений анализируемого показателя выявлено не было. Оценка антирадикальной активности плазмы крови методом с поглощением радикала ABTS оказалась более чувствительной к

наличию мутаций в гене BRCA. Анализ показателей ротовой жидкости также не продемонстрировал наличие статистически значимых различий, однако для плазмы крови BRCA-положительных пациентов с РМЖ был характерен уровень антирадикальной активности (0,45 (0,34/0,52) мМ), сниженный на 62 % относительно данных (0,72 (0,58/0,74) мМ) подгруппы больных, у которых мутаций выявлено не было.

Определение концентрации восстановленной формы глутатиона, ключевого регулятора клеточного окислительного-восстановительного гомеостаза, также показало выраженные тенденции к снижению его в крови и смешанной слюне (рисунок 8). Анализ в крови был проведен с использованием эритроцитарной взвеси, однако результаты обычно коррелируют с данными, которые получают при исследовании сыворотки крови, а также общей антиоксидантной активности, определенной одним из многочисленных методов. В результате проведенных лабораторных исследований было установлено сниженное содержание глутатиона в эритроцитарной взвеси женщин с РМЖ на 22 % относительно нормального значения, определенного у практически здоровых женщин. В ротовой жидкости концентрация анализируемого трипептида определяется значительно сложнее ввиду низких значений параметра, однако даже с использованием колориметрических методов в контрольной группе удастся ее зафиксировать (0,19 (0,15/0,27) мкмоль/л). В основной группе, представленной женщинами с РМЖ, содержание глутатиона было снижено на 16 % . Оценка коэффициента системного / локального содержания метаболита антиоксидантной системы показала в контрольной группе значение 13,3, а в основной группе – 12,3 единицы. Небольшая информативность и низкая диагностическая ценность данного коэффициента обусловлена низким содержанием глутатиона в слюне. В этом отношении имеет перспективу определение глутатиона более чувствительными методами, например, методом иммуноферментного анализа. Дополнительным ограничением для данного коэффициента может быть непрямая связь между содержанием метаболита в эритроцитах (в отличие от плазмы или сыворотки крови) и ротовой жидкости. Это ограничение можно было бы обойти

оценкой тиоловых групп в плазме крови, однако в ротовой жидкости их концентрацию определить еще сложнее.



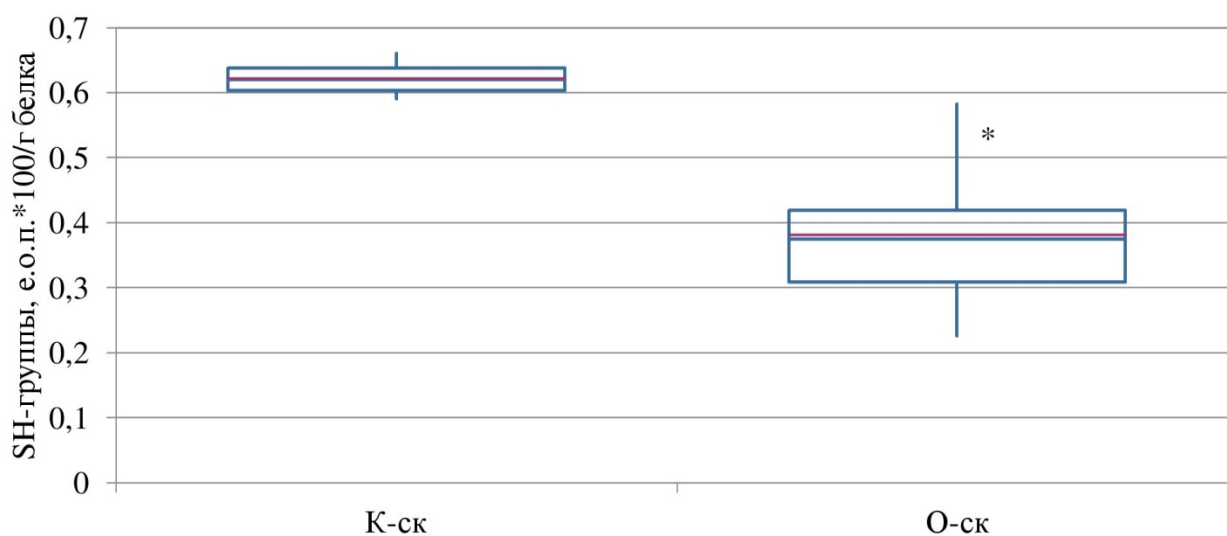
* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением аналогичного маркера контрольной группы. Сокращения: СК – сыворотка крови, РЖ – ротовая жидкость.

Рисунок 8 – Концентрация глутатиона в эритроцитарной взвеси и ротовой жидкости больных раком молочной железы ($Me(p_{0,25}/p_{0,75})$)

Определение концентрации глутатиона у больных подгрупп, разделенных по принципу наличия / отсутствия мутаций гена BRCA, подтвердило влияние этого фактора на показатель эритроцитарной взвеси. В ситуации наличия мутаций в гене BRCA концентрация глутатиона в крови (1,84 (1,74/2,01) мкмоль/л) была на 22 % ниже, чем в подгруппе больных РМЖ без мутаций соответствующего гена. В ротовой жидкости больных основной группы различий выявлено не было.

С учетом методологических сложностей оценку тиоловых групп проводили только в плазме крови испытуемых лиц контрольной и основной групп (рисунок 9). В результате проведенных исследований было установлено сниженное общее содержание SH-групп в плазме крови женщин основной группы на 40 %. Детальный анализ состояния тиолового звена системы антиоксидантной защиты включает оценку легко- и труднодоступных SH-групп, которые обычно определяются по скорости реакции с дитиобиснитробензойной кислотой (реактив Элмана). В контрольной группе распределение легко- и труднодоступных тиоловых групп составило 0,35 (0,32/0,42) при расчете их соотношения. В основной группе больных

РМЖ данный коэффициент был статистически значимо увеличен в 6,1 раза и составил 2,15 (1,54/2,78). Это достаточно стандартная ситуация, широко описанная в литературе и обусловленная конформационными перестройками тиолсодержащими белками плазмы крови в результате оксидативных модификаций и связываний с малыми молекулами – токсическими лигандами. Внутригрупповых различий в содержании тиоловых групп в плазме крови больных РМЖ в зависимости от наличия мутаций в гене BRCA выявлено не было.

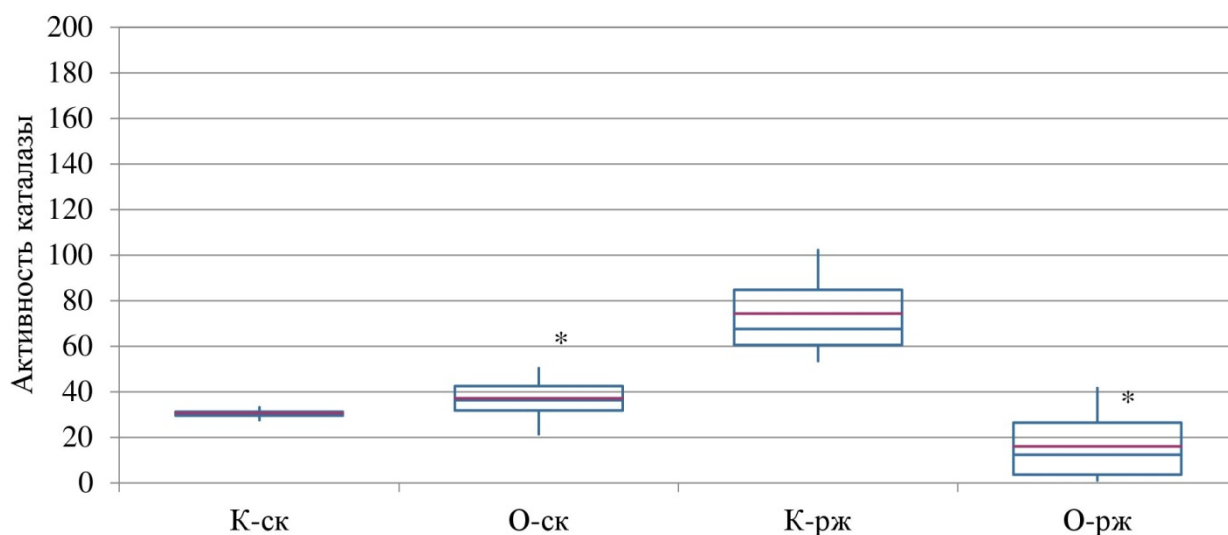


* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением аналогичного маркера контрольной группы. Сокращения: СК – сыворотка крови, РЖ – ротовая жидкость.

Рисунок 9 – Уровень тиоловых групп в плазме крови больных раком молочной железы ($Me(p_{0,25}/p_{0,75})$)

Оценка состояния ферментативного звена системы антиоксидантной защиты включала определение активности каталазы и глутатионпероксидазы в эритроцитарной взвеси и ротовой жидкости (рисунок 10). Использование достаточно высокочувствительных энзиматических методов позволяет точно определять активность ферментов в слюне и других биологических жидкостях человека. Каталазная активность крови больных РМЖ оказалась увеличенной на 19 % относительно контрольных значений, полученных у практически здоровых женщин 1 группы. В ротовой жидкости женщин основной группы наоборот активность каталазы была снижена в 2,5 раза. Высокая вариабельность

ферментативного звена позволила выявить разнонаправленные изменения в биологических жидкостях больных РМЖ, что может быть характерно для разных стадий или степеней компенсации окислительного стресса. Увеличение активности защитного фермента антиоксидантной системы рассматривается как компенсаторная реакция адаптивной фазы, тогда как снижение характерно для декомпенсированной фазы окислительного стресса.

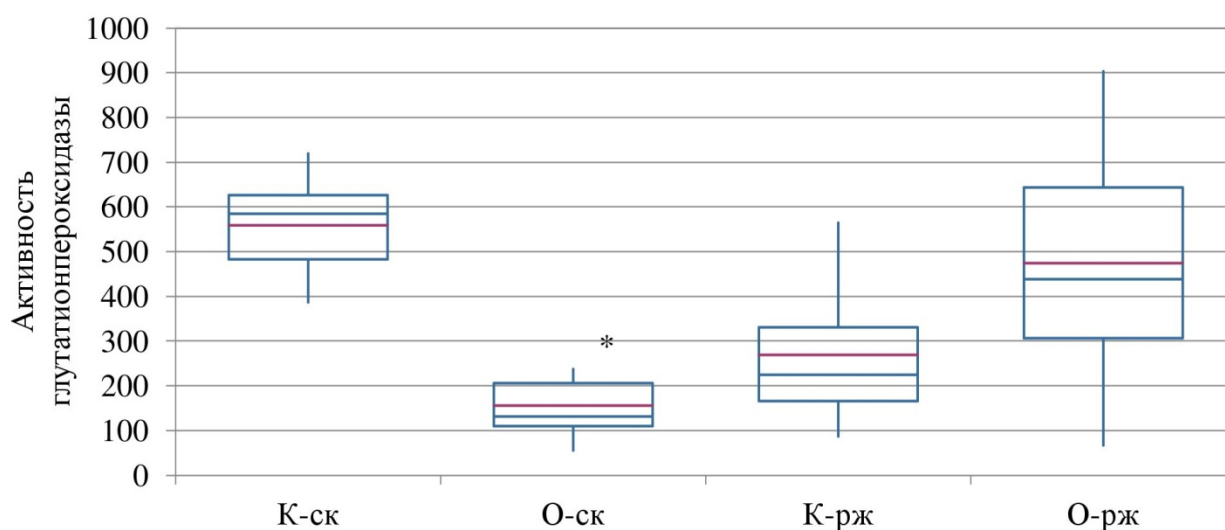


* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением аналогичного маркера контрольной группы. Сокращения: СК – сыворотка крови, РЖ – ротовая жидкость. Единицы измерения: в сыворотке крови – моль/(л*мин), в ротовой жидкости – ммоль/(л*мин).

Рисунок 10 – Активность каталазы в эритроцитарной взвеси и ротовой жидкости больных раком молочной железы ($Me(p_{0,25}/p_{0,75})$)

Изменения активности глутатионпероксидазы (рисунок 11) были противоположны изменениям каталазной активности. В крови женщин основной группы было зарегистрировано снижение активности глутатион-зависимой пероксидазы в 4,4 раза. Активность анализируемого фермента в ротовой жидкости больных РМЖ была напротив увеличена в 1,9 раза относительно контрольной группы. Ввиду такого характера дисбаланса ферментного звена антиоксидантной системы определенный интерес представляет оценка соотношения кровь / ротовая жидкость. В контрольной группе такое соотношение (медианные значения) для каталазной активности составило 463 единицы, для глутатионпероксидазной активности – 2 595. В основной группе соотношения

каталазной активности в крови и слюне составляло 2920, а глутатионпероксидазной – 298.



* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении со значением аналогичного маркера контрольной группы. Сокращения: СК – сыворотка крови, РЖ – ротовая жидкость.

Единицы измерения: в сыворотке крови – ммоль/(л*мин), в ротовой жидкости – мкмоль/(л*мин).

Рисунок 11 – Активность глутатионпероксидазы в эритроцитарной взвеси и ротовой жидкости больных раком молочной железы ($Me(p_{0,25}/p_{0,75})$)

Оценка активности ферментов антиоксидантной защиты (каталазы и глутатионпероксидазы) в крови и ротовой жидкости больных РМЖ в зависимости от наличия / отсутствия мутаций в гене BRCA не позволила выявить внутригрупповые статистически значимые различия.

Для оценки потенциала использования ротовой жидкости с диагностическими целями у больных РМЖ был проведен корреляционный анализ показателей антиоксидантной системы на системном и местном уровнях. В контрольной группе статистически значимые корреляции наблюдались в ограниченном перечне случаев и были характерны для общей антиоксидантной активности, определенной железо-восстанавливающим способом ($r = 0,4140$, $p = 0,0048$) или способом оценки антирадикальной активности ($r = 0,3780$, $p = 0,0108$). В остальных случаях, по причине относительной обособленности метаболических систем полости рта в норме, не было выявлено значимых корреляционных взаимосвязей для группы практически здоровых женщин.

Корреляционный анализ лабораторных показателей основной группы больных РМЖ подтвердил высокую информативность саливадиагностики функционального состояния системы антиоксидантной защиты. Коэффициент корреляции при сравнении общей антиоксидантной активности (железо-восстанавливающий способ определения) плазмы крови и слюны составил $r = 0,6082$ ($p = 0,0078$). Для антирадикальной активности в основной группе женщин был определен коэффициент корреляции умеренной силы $r = 0,5206$ ($p = 0,0090$). Концентрация глутатиона в слюне была очень низкой, особенно в группе больных РМЖ, что помешало выявить закономерности взаимосвязи анализируемого метаболита на системном и местном уровне. Можно было бы ожидать наличие отрицательной корреляции между активностью каталазы или глутатионпероксидазы в крови и слюне, однако статистически значимых закономерностей в этом случае выявлено не было. Мы считаем, что причиной могут быть асинхронные изменения активности ферментов антиоксидантной защиты в крови и ротовой жидкости с учетом разных фаз окислительного стресса (компенсации или декомпенсации).

Представленные в данной главе данные продемонстрировали развитие окислительного стресса с дисбалансом прооксидантных и антиоксидантных факторов в крови и ротовой жидкости больных РМЖ. Сам по себе установленный патологический процесс выявлен не впервые, однако в работе доказана возможность частичной замены инвазивного забора крови неинвазивным сбором смешанной слюны. Это подтверждено наличием статистически значимых изменений общей антиоксидантной активности, содержания ТБК-реактивных продуктов и 8-OHdG на местном уровне и статистически значимой корреляцией таких изменений в слюне с дисбалансом окислительного гомеостаза в крови. Оценка тиолового звена и ферментов антиоксидантной системы при этом полностью не выпадает из диагностического процесса, но в большей степени обеспечивает уточнение степени компенсации или тяжести окислительного стресса в полости рта.

4.3 Анализ влияния биохимического профиля больных раком молочной железы на 2-х летнюю выживаемость

С целью создания прогностической модели выживаемости больных раком молочной железы был проведен анализ влияния на данную клиническую характеристику изученных биохимических показателей, описанных в предыдущих разделах работы. Анализ был построен по классической схеме с применением однофакторного и многофакторного регрессионного метода. Включение в однофакторный анализ общеклинических биохимических показателей, а также онкомаркеров позволило установить статистически значимое влияние исходного уровня мочевины с данными двухлетней выживаемости больных. Остальные лабораторные биохимические характеристики при определении на этапе постановки диагноза не оказывали влияние на дальнейшее течение патологического процесса и его результат. Сильная зависимость была установлена между выживаемостью больных и наличием мутаций гена BRCA1 (таблица 12).

Таблица 12 – Регрессионные модели Кокса по данным однофакторного анализа для биохимических показателей крови

Маркер	Me(Q ₁ /Q ₃)	β	Отношение рисков (HR)	p
1	2	3	4	5
Билирубин общий, мкмоль/л	7,8 (6,3/9,1)	0,05	1,05	0,38
Общий белок, г/л	72,7 (68,1/79,2)	0,01	1,01	0,86
Мочевина, ммоль/л	5,4 (3,7/5,9)	0,46	1,58	0,0245
Креатинин, мкмоль/л	73,9 (67,0/81,0)	0,01	1,01	0,67
Глюкоза, мкмоль/л	5,61 (4,98/6,22)	-0,05	0,95	0,87
Холестерин, мкмоль/л	5,35 (4,86/6,12)	-0,53	0,59	0,16
ЛДГ, ед/л	222,7 (197,2/236,6)	0,004	1,00	0,52
АЛТ, ед/л	19,5 (16,8/30,3)	0,02	1,02	0,50
АСТ, ед/л	23,0 (17,8/35,5)	0,01	1,01	0,68

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4	5
СРБ, мг/л	3,92 (2,10/4,94)	–0,15	0,86	0,32
РЭА, нг/мл	4,4 (2,7/5,8)	–0,12	0,89	0,50
СА 125, ед/мл	23,4 (14,4/27,8)	–0,02	0,98	0,37
СА 15-3, ед/мл	17,1 (11,4/24,9)	–0,04	0,96	0,28
ПТГрП, нг/мл	289 (268/325)	–0,01	0,99	0,31
Наличие мутаций BRCA1	28 %	1,61	4,99	0,0131

Для анализа влияния исходного состояния окислительных нарушений на выживаемость больных раком молочной железы были проанализированы прямые маркеры состояния системы антиоксидантной защиты и свободнорадикальных повреждений биомолекул (таблица 13). Из всего перечня лабораторных маркеров окислительного стресса для 2-х была выявлена статистически значимая взаимосвязь с двухлетней выживаемостью больных. Эти показатели – железо-восстанавливающая способность и уровень тиоловых групп плазмы крови, которые также хорошо коррелируют друг с другом.

Таблица 13 –Регрессионные модели Кокса по данным однофакторного анализа для маркеров окислительного стресса

Маркер	Me(Q ₁ /Q ₃)	β	Отношение рисков (HR)	p
ОАОА, mM	0,69 (0,57/0,79)	–5,99	0,002	0,0295
Каталаза, моль/(л*мин)	36,2 (31,7/42,5)	0,01	1,01	0,74
ГПО, мкмоль/(л*мин)	131 (110/207)	0,002	1,00	0,55
Глутатион, ммоль/мл	2,0 (1,8/2,3)	–0,03	0,97	0,97
Тиоловые группы, усл. ед.	0,37 (0,31/0,42)	7,96	2860,62	0,0176
ТБК–реактивные продукты, усл. ед.	0,8 (0,6/1,0)	–0,38	0,68	0,70

Многофакторный анализ был основан на введении показателей, которые продемонстрировали статистически значимое влияние на двухлетнюю выживаемость пациенток с раком молочной железы при однофакторном анализе. Таким образом, были проанализированы: мочевины, общая антиоксидантная активность, тиоловые группы плазмы крови и наличие мутаций гена BRCA1. Методом подбора была получена оптимальная комбинация факторов: мутации BRCA1 и общая антиоксидантная активность. Характеристики многофакторного анализа для данной комбинации представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Регрессионные модели Кокса по данным многофакторного анализа

Маркер	β	Отношение рисков (HR)	p
Наличие мутаций BRCA1	2,17	8,74	0,0069
ОАОА	-7,14	0,001	0,0339

Таким образом, для прогноза выживаемости больных раком молочной железы в течение 2 лет можно использовать уравнение (4):

$$X = -2,17 \times \text{Мутации BRCA1} + 7,14 \times \text{ОАОА}, \quad (4)$$

где наличие мутаций в гене BRCA1 кодируется «1», отсутствие «0»; уровень антиоксидантной активности выражается в мМ аскорбиновой кислоты, принятой за стандарт.

Больные основной группы были стратифицированы в соответствии с уровнем риска по данным предложенного выше уравнения. Анализ ROC-кривой (рисунок 12) для больных раком молочной железы продемонстрировал высокую диагностическую ценность разработанного коэффициента, характеризующуюся показателем AUC 0,852 с высокими значениями специфичности (88 %) и чувствительности (94 %) теста при пороговом значении 3,55. Значения ниже 3,55 были приняты соответственно за высокий уровень риска летальности.

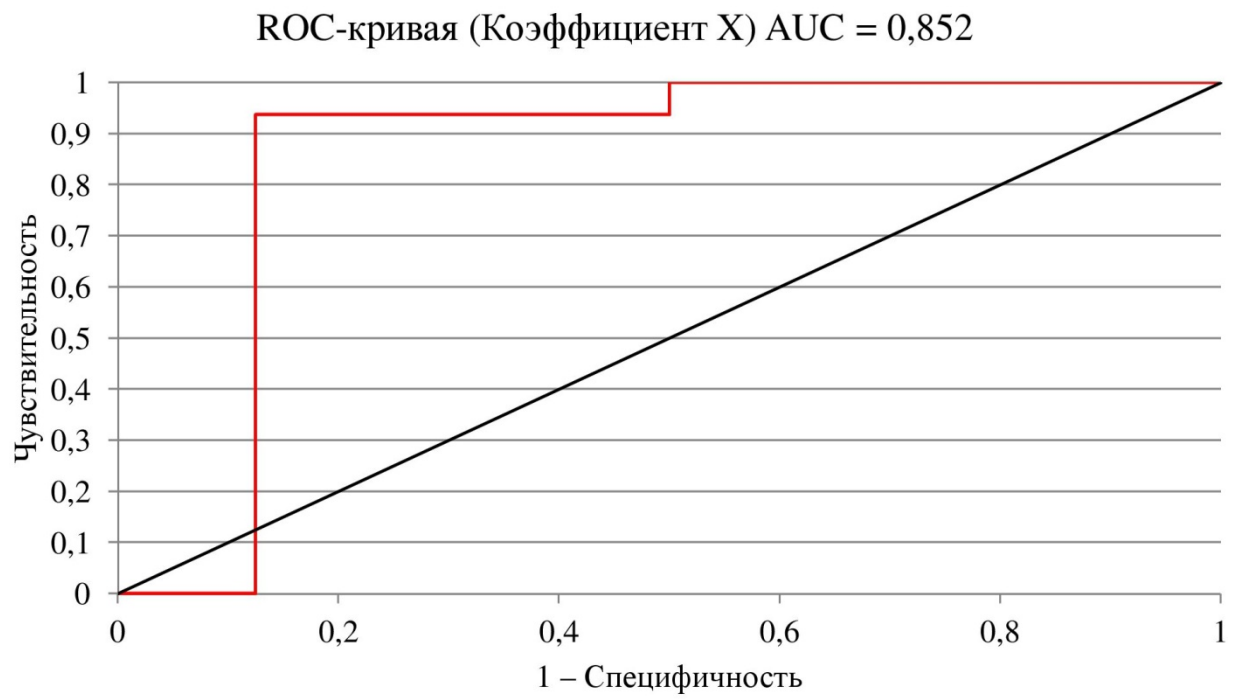


Рисунок 12 – ROC-кривая расчетного коэффициента выживаемости больных раком молочной железы в течение 2 лет (AUC = 0,852)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Раннее обнаружение РМЖ обещает облегчить лечение (небольшие операции, меньше лучевой терапии или химиотерапии) и улучшить выживаемость пациентов. Обычный скрининг (физикальное обследование и маммография) имеет недостаточные чувствительность и специфичность [78]. Существует растущая потребность в новых терапевтических стратегиях, а также в биомаркерах, которые могут обеспечить эффективное неинвазивное раннее обнаружение РМЖ. Существует острая потребность в разработке быстрых, высокоточных и неинвазивных инструментов для скрининга рака, раннего выявления, диагностики, определения стадии и прогнозирования. Обнаружение молекулярных биомаркеров РМЖ на основе биожидкостей привлекло большое внимание в клиническом сообществе из-за его неинвазивности, возможности раннего обнаружения путем скрининга пациентов с высоким риском и пригодности для мониторинга и лечения рака. Обнаружение биомаркеров, связанных с раком, в биожидкостях организма значительно улучшилось благодаря недавним достижениям в высокопроизводительной технологии анализа, которая может позволить чувствительную и надежную оценку уровня молекулярных мишеней. Плазма была основным биоматериалом для тестирования онкомаркеров по очевидным причинам, но другие биологические жидкости, такие как спинномозговая жидкость, моча и слюна, были исследованы на предмет возможности их клинического использования в качестве диагностической матрицы, содержащей биомаркеры, связанные с раком.

Разработка неинвазивного инструмента на основе слюны для раннего выявления РМЖ может позволить клиницистам диагностировать РМЖ раньше (путем выявления пациентов, требующих более тщательного последующего наблюдения и дополнительной визуализации) и уменьшать количество ненужных биопсий (количество которых по данным Американского общества рака составляет в настоящее время около 80 %).

В результате проведенных исследований были получены данные, свидетельствующие о возможности совершенствования лабораторной диагностики РМЖ на основе сочетанного применения анализа патобиохимических биомаркеров крови и ротовой жидкости как для ведения пациентов с установленным диагнозом, так и у лиц группы риска развития этой онкопатологии. Универсального диагностического показателя или комбинации дополнительных критериев выявления РМЖ не существует, что связано со значительной гетерогенностью заболевания. Гетерогенная сложность РМЖ создает огромные проблемы для клинического использования биомаркеров, а различные технологии их исследования по-прежнему имеют технические проблемы воспроизводимости и высокого уровня ложноположительных результатов. Чтобы достичь достаточной диагностической мощности в клинической эффективности и избежать получения ложных результатов, крайне важно иметь высокочувствительную и специфичную платформу обнаружения биомаркеров, включая возможность полногеномного профилирования связанных мутаций, которая по-прежнему сопряжена с некоторыми техническими и практическими препятствиями, которые необходимо преодолеть для практического клинического использования.

Биомаркеры, которые обнаруживают рак, прогнозируют его исход и влияют на выбор лечения, будут играть важную роль в будущем лечении РМЖ. Комбинация объективного биомаркера, указывающего на возможность появления РМЖ, (позволяющего подозревать вероятность этого события), с установленной клинической диагностикой может помочь повысить признание программ скрининга РМЖ среди населения за счет создания индивидуального профиля риска, который не зависит от качества и интерпретации маммографии. Инструментом получения прогноза и средством его выражения являются предикторы. Простой, надежный и недорогой неинвазивный тест для скрининга и диагностики может быть легко выполнен в любой медицинской практике. В качестве следующего шага к персонализированной медицине недавние разработки биомаркеров, касающихся характеристик врожденных опухолей,

могут способствовать более индивидуализированному лечению РМЖ. Таким образом, представляется целесообразным внедрение надежного неинвазивного теста в качестве предиктора для дальнейшей диагностики бессимптомных пациентов. На втором этапе только пациенты с положительным биомаркером-предиктором развития РМЖ будут получать дальнейшую визуализацию или биопсию. Бессимптомные пациенты с отрицательным биомаркером-предиктором РМЖ не нуждаются в дополнительной клинической диагностике и избавлены от неопределенностей и беспокойства из-за неоднозначных результатов визуализации.

Данный алгоритм позволяет обосновать дополнение стандартного перечня лабораторных исследований при РМЖ путем одновременного тестирования в крови и ротовой жидкости констелляции биохимических характеристик в рамках комбинированной диагностической панели, включающей как общеизвестные лабораторно-диагностические критерии РМЖ, так и новые эндогенные биохимические молекулярные паттерны (рисунок 13).

Актуальной задачей является поиск и идентификация высокочувствительных и специфичных биомаркеров РМЖ для скрининга, диагностики доклинических форм заболевания, оценки эффективности проводимой терапии, уменьшения риска возникновения рецидивов и метастазов. В последние годы огромные усилия были направлены на разработку биомаркеров, специфичных для РМЖ. К сожалению, только несколько биомаркеров вошли в рутинное использование. Еще меньшее количество было одобрено для скрининга или диагностики населения. Было приложено много усилий для развития технологий саливадиагностики, которые, вероятно, произведут революцию в способах диагностики раковых заболеваний в будущем [128]. Используемые в настоящее время методы лабораторной диагностики РМЖ и связанные с ними диагностические процедуры не являются совершенными. Результаты диссертационного исследования не позволяют дать однозначную биохимическую оценку диагностического потенциала ПТГрП крови и РЖ в качестве биомаркера РМЖ. Полученные результаты позволяют заключить, что зафиксированные



CA15-3 – раковый антиген; Her2/neu – человеческий эпидермальный рецептор 2; CA27-29 – раковый антиген; РЭА – раковоэмбриональный антиген; ЦОК – циркулирующие опухолевые клетки; цДНК – циркулирующая ДНК; СОД – супероксиддисмутаза, КАТ – каталаза, GSH – восстановленный глутатион, окисленный (GSSG) глутатион и окислительно-восстановительный статус глутатиона (GSH/GSSG), МДА – малоновый диальдегид, ТБКРП – вещества, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой; ТАС – общая антиоксидантная способность; FRAP – железовосстанавливающий антиоксидант; ПТГрП – паратгормон-родственный протеин; ER – рецепторы эстрогена, PR – рецепторы прогестерона; BRCA1 и BRCA2; МГ – маммография, ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография; мМРТ – молекулярно-магнитно-резонансная томография; ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография; МРТ – магнитно-резонансная томография; УЗИ – ультразвуковое исследование; КТ – компьютерная томография.

Рисунок 13 – Алгоритм скрининга, диагностики, прогнозирования и мониторинга рака молочной железы на основании оценки статуса рецепторов эстрогена и прогестерона, биохимических показателей крови и ротовой жидкости, данных анатомической и молекулярной визуализации, профиля онкомаркеров, статуса прооксидантно-антиоксидантной системы и наличия генетически ассоциированных признаков исследуемой онкопатологии

изменения содержания ПТГрП в крови и ротовой жидкости у больных РМЖ по сравнению с контрольной группой исследуемых не могут рассматриваться, как безусловно отличительные признаки данного заболевания, но являются дополнительными аргументами для подтверждения диагноза. Полученные результаты свидетельствуют, что исследование содержания этого мультипотентного белка в плазме и РЖ является потенциально возможным инструментом для раннего обнаружения онкопатологии молочной железы, что соответствует существующим в современной литературе представлениям о непосредственном участии ПТГрП в онкогенезе РМЖ и может предоставить потенциально значимую диагностическую и прогностическую информацию. Этот протеин нуждается в более глубоком изучении как в качестве потенциального биомаркера РМЖ, участвующего в различных стадиях формирования опухоли, так и в качестве вероятной терапевтической мишени. Необходимы дополнительные исследования для расширенного непредвзятого анализа возможности использования тестирования содержания ПТГрП в биожидкостях в клинической практике для совершенствования диагностики РМЖ в сочетании с другими общепринятыми методами в составе комбинации ряда диагностических биомаркеров. Это позволит лучше понять взаимосвязь РМЖ и ПТГрП и потенциал этого уникального протеина в качестве биомаркера РМЖ.

Еще менее специфичным биомаркером для больных РМЖ являются ферменты-индикаторы цитолитического синдрома, в частности ЛДГ. Высокий уровень активности ЛДГ в сыворотке крови свидетельствует о негативном общем прогнозе, наличии метастазов и отсутствии позитивной динамики после оперативного вмешательства. Так о прогрессировании опухолевого процесса может свидетельствовать резкий рост активности ЛДГ в течение 6 месяцев после оперативного вмешательства. В нашем исследовании показано, что альтернативным биомаркером, не менее информативным, но еще более простым в лабораторном мониторинге, может служить активность ЛДГ в смешанной слюне. Дополнительным преимуществом использования данного маркера является не только его зависимость от цитолиза клеток злокачественных новообразований, но

и более высокая экспрессия фермента в таких клетках, обусловленная перестройкой клеточного метаболизма с адаптацией к анаэробным условиям.

Трансляционные исследования и технологии на основе слюны могут быть оценены для определения их полезности при обнаружении РМЖ. Исследования нескольких лабораторий оценили потенциальное использование белков слюны, таких как c-erbB-2, VEGF, EGF и CEA, при первоначальном выявлении и / или последующем скрининге рецидива РМЖ [85, 180, 190, 191, 196, 197]. В настоящее время имеется ограниченное количество данных, подтверждающих предполагаемое использование биомаркеров слюны в качестве диагностических инструментов для рака молочной железы.

Исследование взаимосвязи состава ротовой жидкости с компонентами крови не всегда необходимо, хотя часто это целесообразно. В то же время использование ротовой жидкости в клинико-лабораторной диагностике связано с необходимостью установления критериев нормы и патологии по каждому биохимическому показателю. Перспективным направлением исследований, по-видимому, является увеличение перечня биомаркеров, идентифицируемых в ротовой жидкости, а также повышение чувствительности и воспроизводимости тестов их обнаружения, а также оценка экономической эффективности их внедрения в клиническую лабораторную диагностику. Клиническая и научная аттестация ротовой жидкости для выявления системных заболеваний представит эффективную новаторскую технологию, которая существенно трансформирует молекулярную лабораторную диагностику.

Поиск достаточно информативной комбинации потенциальных биомаркеров РМЖ наиболее перспективен в параллельных исследованиях крови и слюны. Использование слюны для обнаружения, диагностики и мониторинга РМЖ является многообещающей перспективой. Несмотря на глубину и широту саливаомики и многообещающие результаты саливадиагностики, представленные в многочисленных публикациях, эти исследования различаются по многим параметрам, включая размер выборки, тип слюны (стимулированная или нестимулированная слюна), метод сбора слюны, метод измерения слюнных

биомаркеров, тип и методология обнаружения и измерения биомаркеров. Эти вариации в дизайне исследования потенциально могут повлиять на диагностическую точность слюнных биомаркеров, и поэтому новые исследования диагностической ценности биомаркеров слюны для диагностики РМЖ весьма оправданы. Будущие исследования, которые будут должным образом, учитывают различные потенциальные искажающие факторы, могут подтвердить и точно настроить эффективность тестирования слюнных биомаркеров для клинического использования при выявлении РМЖ [84, 177].

В недавней литературе обсуждаются клиническое значение и перспективы применения ротовой жидкости/слюны для раннего выявления РМЖ с потенциалом дальнейшего развития в трансляционной и персонализированной медицине. Валидность саливадиагностики для обнаружения рака в перспективе может быть успешно сопоставлена с клиническим диагнозом и дополнительно исследована для использования в качестве биомаркеров гистологической классификации и клинической стадии заболевания [134].

Дальнейшие разработки представленной темы исследования могут быть связаны с поиском еще более эффективных схем комбинированного использования уже известных лабораторно-диагностических критериев, так и новых перспективных подходов на основе тестирования конstellации потенциальных биомаркеров РМЖ в ротовой жидкости и крови. Учитывая логистические преимущества диагностического тестирования слюны/ротовой жидкости и смертоносность заболевания, диагностику которого необходимо усовершенствовать, было бы чрезвычайно полезно продолжить изучение возможности использования слюны в качестве среды для повышения эффективности лечения и предотвращения рецидива РМЖ [190].

Должно быть определено научное обоснование использования цельной слюны как надежной биожидкости для обнаружения РМЖ. Крайне важно выяснить биологический механизм наличия слюнных биомаркеров, связанных с РМЖ, и детали появления биомолекул ракового происхождения в слюне. Недавние исследования подтвердили роль экзосом в системном распределении

биомолекул, специфичных для заболевания, включая биомаркеры, специфичные для рака. Однако необходимы дополнительные исследования, чтобы углубить наше понимание биогенеза и биораспределения экзосомальных биомаркеров в слюне. В настоящее время еще предстоит решить, какова роль слюнных желез в этом процессе и выяснить механизмы присутствия биомаркеров РМЖ в слюне. Наряду с недавними научными достижениями возникает необходимость перенести диагностику с использованием биомаркеров слюны из исследовательских лабораторий в клиническую практику. Технологии оказания медицинской помощи на месте (Point-of-care) могут обеспечивать неинвазивные, быстрые, простые и точные измерения непосредственно по слюне для мониторинга различных заболеваний, включая рак. Широкий спектр новых технологий на основе слюны уже продемонстрировал свою надежность в раннем обнаружении многих раковых заболеваний. Очевидно, что будет развиваться тенденция к постоянному совершенствованию инструментов диагностики РМЖ с использованием передовых технологий жидкостной биопсии, включая исследование биомаркеров в крови и ротовой жидкости [124, 125].

Необходимы поиски новых методов диагностики и онкомаркеров, обладающих высокой специфичностью, чувствительностью, низкой стоимостью и позволяющих выявлять ранние стадии развития опухолевого процесса. Использование единственного биомаркера для диагностики, прогноза или лечения рака, несомненно, упрощает процедуру, однако часто недостаточно информативно. Одно из возможных решений – одновременное использование пула биомаркеров для достижения желаемой цели. Использование комбинации биомаркеров продемонстрировало лучшую диагностическую чувствительность и специфичность, чем тестирование отдельных маркеров. Это также снизит вероятность ложного диагноза, поскольку надежность панели биомаркеров лучше, чем использование только одного биомаркера. Современные исследования позволяют увеличить набор скрининговых и прогностических маркеров и выявить их комбинации, наиболее ценные с диагностической точки зрения. По нашему мнению, перспективным и актуальным направлением в онкологии представляется

поиск новых констелляций биомаркеров РМЖ путем параллельного исследования крови и слюны и разработке на этой основе эффективных тактик скрининговых и ранних диагностических исследований. Следовательно, изучение и описание особенностей констелляций, исследуемых биохимических и генетических показателей крови и слюны, при РМЖ представляет не только научную, но и практическую ценность для совершенствования лабораторных методов диагностики этого заболевания. Утверждается [180], что слюна является информативным объектом исследования опухолевых маркеров при РМЖ и заслуживает дальнейшего изучения. Полагают, что исследование слюны на опухолевые маркеры не заменит стандартный скрининговый физикальный осмотр и маммографию. Тем не менее, новый подход с использованием саливадиагностики может потенциально улучшить способность выявлять РМЖ на ранней стадии, когда он еще излечим [173]. Исследования слюны могут оказаться такими же полезными, как и исследования биомаркеров крови в лабораторной диагностике РМЖ. Вопрос о взаимосвязи биохимических и генетических факторов слюны и крови в диагностике и контроле эффективности химиотерапевтического лечения РМЖ, а также перспектив использования их наиболее информативных констелляций для ранней диагностики этого заболеваний в настоящее время становится предметом детальных научных исследования, что подтверждается данными литературы.

Биомаркеры слюны обладают дискриминационной способностью распознавать РМЖ, обладая высокой специфичностью и чувствительностью, что прокладывает путь к проверке достоверности модели прогнозирования, за которой следует ключевая клиническая проверка [152].

Саливадиагностика РМЖ находится на начальном этапе своего становления и поэтому необходимы дополнительные исследования и дополнительные усилия для преодоления множества препятствий на этом пути. Тем не менее, перспективность этого подхода в онкомамологии очевидна [139]. Вполне возможно, что в будущем тестирование, как крови, так и слюны станет нормой. Полагают, что, тестирование слюны, скорее всего, следует дополнять

исследованием крови, а также другими параметрами для повышения чувствительности и практической полезности. Идентификация в слюне или других жидкостях молекул, прямо или косвенно связанных с опухолями, имеет потенциал помимо раннего обнаружения. Это может позволить оценить индивидуальный риск развития рака, предсказать, как будет развиваться опухоль, или контролировать терапевтический ответ неинвазивным способом, что позволит разработать персонализированную медицину. Многие фундаментальные и клинические исследования дополняют существующие представления о возможностях скрининга и диагностики РМЖ и одновременно создают дополнительную диагностическую платформу, которая будет включать информативную констелляцию лабораторных методов тестирования ротовой жидкости и крови для более точного, безболезненного и экономичного выявления этого опасного и очень распространенного заболевания по сравнению с лучшими современными диагностическими подходами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 2021 году РМЖ стал наиболее часто диагностируемым злокачественным новообразованием у женщин во всем мире и основной причиной смерти от рака среди женщин [57, 192]. За последние годы отмечен неуклонный рост рака молочной железы в России, который является одним из самых частых онкологических заболеваний, диагностируемых у женщин [6, 12]. Современным трендом в диагностике РМЖ является разработка неинвазивных/малоинвазивных диагностических процедур. Чувствительный анализ, который легко и точно идентифицирует биомаркеры с использованием неинвазивно собранных клинических образцов, в том числе ротовой жидкости, оптимален для выявления и скрининга РМЖ. Слюна, содержащая большое количество биохимических и генетических биомаркеров, считается многообещающим биологическим материалом для раннего выявления заболеваний [172, 173]. Разработка неинвазивного инструмента на основе слюны для раннего выявления РМЖ может позволить клиницистам диагностировать РМЖ раньше (путем выявления пациентов, требующих более тщательного последующего наблюдения и дополнительной визуализации) и уменьшать количество ненужных биопсий (количество которых по данным Американского общества рака составляет в настоящее время около 80 %).

Поэтому цель исследования было определение диагностических аспектов ряда биохимических показателей крови и ротовой жидкости при раке молочной железы в их взаимосвязи с генетическими изменениями, характерными для этой патологии.

В настоящее исследование было включено 75 пациентов: 1) женщины ($n = 25$) без онкопатологии и иных выявленных на момент исследования заболеваний; 2) женщины ($n = 50$) с установленным диагнозом РМЖ; 3) женщины ($n = 25$) с подозрением на вероятность последующего возникновения онкопатологии молочных желез. Все исследуемые были обследованы с использованием методов биохимической идентификации специфических

онкомаркеров, показателей окислительного гомеостаза и наличия признаков, генетически ассоциированных с риском развития исследуемой онкопатологии.

Определение маркеров белкового (общий белок, мочевины, креатинин, билирубин), углеводного (глюкоза) и липидного (общий холестерин) обмена в сыворотке крови и ротовой жидкости больных РМЖ продемонстрировало практически полное соответствие нормальным значениям аналогичных показателей, характерных для контрольной группы. Концентрация общего холестерина в сыворотке крови была увеличена на 23 %, а содержание мочевины было увеличено на 55 % в смешанной слюне больных основной группы относительно контрольной группы.

Определение минерального состава ротовой жидкости женщин с РМЖ оказалось более информативным, чем сыворотки крови, и продемонстрировало увеличенное значение концентраций ионов железа на 33 % и калия на 17 % в сравнении с аналогичными показателями контрольной группы. Это свидетельствует о деструктивных процессах в ротовой полости с высвобождением содержимого из разрушенных клеток в слюну.

Более интересные данные были получены в ходе определения активности ферментов в сыворотке крови и ротовой жидкости больных РМЖ. В крови больных основной группы активность ЛДГ была увеличена на 69 % в сравнении с контрольной группой, активность альфа-амилазы – на 65 %. В ротовой жидкости больных РМЖ активность ЛДГ была увеличена даже в большей степени, чем в крови – в 2,2 раза, активность аминотрансфераз была увеличена в 2,2–2,3 раза, ЩФ – в 4,7 раза. Наглядно прослеживается преобладание изменений в смешанной слюне над системными перестройками в крови. В основной группе женщин с РМЖ было также установлено наличие положительной корреляции умеренной силы ($r = 6058$, $p < 0,001$) для активности ЛДГ и корреляции слабой силы ($r = 2430$, $p = 0,0245$) для активности ЩФ. ЛДГ, аминотрансферазы и ЩФ не являются специфическими маркерами онкопатологии, однако анализ активности ферментов-маркеров цитолиза в крови больных РМЖ имеет цель оценки общей тяжести патологического процесса, состояния внутренних органов и

прогнозирования дальнейшего прогрессирования болезни и эндогенной интоксикации. Из литературных данных известно, что устойчиво высокий уровень внезапное повышение уровня ЛДГ в сыворотке после операции в течение шести месяцев или в течение длительного периода может указывать на плохой результат или метастазы (Agrawal A. et al., 2016). Анализ изменений активности этого фермента в ротовой жидкости потенциально может упростить задачу лабораторного мониторинга при аналогичной для сыворотки крови диагностической ценности.

В крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы были определены следующие онкомаркеры: РЭА (раковый эмбриональный антиген), СА125 (карбогидрат-антиген-125-онкомаркер яичников, СА15-3 (карбогидрат-антиген-15-3-онкомаркер молочной железы). Оценка изменений сывороточного уровня вышеперечисленных онкомаркеров показала слабо выраженную тенденцию к увеличению их концентрации, что ограничивает их диагностическую ценность. Одним из наиболее перспективных направлений поиска новых онкомаркеров является анализ диагностической ценности паратгормон-родственного протеина (ПТГрП), в том числе при определении его концентрации в смешанной слюне. В опытной группе больных уровень анализируемого белка в сыворотке крови был на 25 % выше, чем в контрольной ($p = 0,0082$), в ротовой жидкости также были определены увеличенные его значения в 2,2 раза относительно контроля ($p = 0,0125$). Оценка уровня взаимосвязи между концентрацией ПТГрП в крови и ротовой жидкости у здоровых испытуемых лиц показала наличие положительной корреляционной связи, коэффициент корреляции составил 0,8011 ($p = 0,0303$), в опытной группе коэффициент корреляции составил 0,53 ($p = 0,0019$). Соотношение содержания ПТГрП на системном и местном уровнях в контрольной группе составила 7,9. Для основной группы больных этот коэффициент составил 4,4, что наглядно демонстрирует возрастание роли смешанной слюны в определении данного биомаркера при злокачественных новообразованиях молочной железы.

Метаболические нарушения, развивающиеся при злокачественных новообразованиях, характеризуются дисбалансом прооксидантно-антиоксидантной

системы, что обуславливает направление анализа использования маркеров окислительного стресса в крови и слюне в лабораторном мониторинге РМЖ.

Определение концентрации ТБК-реактивных продуктов показало увеличенные значения данного маркера окислительного стресса в крови больных раком молочной железы на 25 %, а в ротовой жидкости – в 2,9 раза относительно значений показателя контрольной группы. В плазме крови концентрация 8-OHdG была увеличена в 1,9 раза относительно контроля ($p < 0,001$), в ротовой жидкости анализируемый показатель превышал контрольные цифры всего на 14 % ($p = 0,1412$). В основной группе больных РМЖ интенсивное образование ТБК-реактивных продуктов и 8-OHdG способствовало увеличению их проникновения в жидкость полости рта, что отразилось на коэффициентах корреляции. Для ТБК-реактивных продуктов липопероксидации: $r = 0,3407$ ($p = 0,0430$), для 8-OHdG коэффициент составил $r = 0,4550$ ($p = 0,0215$), что характеризует связь умеренной силы.

Оценка общей антиоксидантной активности, определяемой железо-восстанавливающим способом, показала сниженные ее значения в биологических жидкостях больных РМЖ. В сыворотке крови женщин основной группы данный показатель был снижен в 2,2 раза, в ротовой жидкости – на 61 % при сравнении с контрольными значениями соответствующих показателей. Антирадикальная способность сыворотки крови больных РМЖ была снижена на 25 % на системном уровне, а в ротовой жидкости – в 2,4 раза.

Корреляционный анализ лабораторных показателей основной группы больных РМЖ подтвердил высокую информативность саливадиагностики функционального состояния системы антиоксидантной защиты. Коэффициент корреляции при сравнении общей антиоксидантной активности (железо-восстанавливающий способ определения) плазмы крови и слюны составил $r = 0,6082$ ($p = 0,0078$). Для антирадикальной активности в основной группе женщин был определен коэффициент корреляции умеренной силы $r = 0,5206$ ($p = 0,0090$).

Было установлено сниженное содержание глутатиона в эритроцитарной взвеси женщин с РМЖ на 22 % относительно нормального значения,

определенного у практически здоровых женщин. В ротовой жидкости женщин основной группы содержание глутатиона было снижено на 16 %. Установлено сниженное общее содержание SH-групп в плазме крови женщин основной группы на 40 %. В контрольной группе распределение легко- и труднодоступных тиоловых групп составило 0,35 (0,32/0,42) при расчете их соотношения. В основной группе больных РМЖ данный коэффициент был статистически значимо увеличен в 6,1 раза и составил 2,15 (1,54/2,78).

Каталазная активность крови больных РМЖ оказалась увеличенной на 19 % относительно контрольных значений, полученных у практически здоровых женщин 1 группы. В ротовой жидкости женщин основной группы наоборот активность каталазы была снижена в 2,5 раза. Высокая вариабельность ферментативного звена позволила выявить разнонаправленные изменения в биологических жидкостях больных РМЖ, что может быть характерно для разных стадий или степеней компенсации окислительного стресса. Изменения активности глутатионпероксидазы были противоположны изменениям каталазной активности: в крови женщин основной группы было зарегистрировано снижение активности фермента в 4,4 раза, в ротовой жидкости активность глутатионпероксидазы была увеличена в 1,9 раза относительно контрольной группы. Таким образом, полученные данные продемонстрировали развитие окислительного стресса с дисбалансом прооксидантных и антиоксидантных факторов в крови и ротовой жидкости больных РМЖ. Сам по себе установленный патологический процесс выявлен не впервые, однако в работе доказана возможность частичной замены инвазивного забора крови неинвазивным сбором смешанной слюны. Это подтверждено наличием статистически значимых изменений общей антиоксидантной активности, содержания ТБК-реактивных продуктов и 8-OHdG и корреляцией таких изменений в слюне с дисбалансом окислительного гомеостаза в крови. Оценка тиолового звена и ферментов антиоксидантной системы при этом полностью не выпадает из диагностического процесса, но в большей степени обеспечивает уточнение степени компенсации или тяжести окислительного стресса в полости рта.

В результате проведенных исследований были получены данные, свидетельствующие о возможности совершенствования лабораторной диагностики РМЖ на основе сочетанного применения анализа патобиохимических биомаркеров крови и ротовой жидкости как для ведения пациентов с установленным диагнозом, так и у лиц группы риска развития этой онкопатологии. Биомаркеры слюны обладают дискриминационной способностью распознавать РМЖ, обладая высокой специфичностью и чувствительностью, что прокладывает путь к проверке достоверности модели прогнозирования. Универсального диагностического показателя или комбинации дополнительных критериев выявления РМЖ не существует, что связано со значительной гетерогенностью заболевания. На основании литературных и собственных данных предложен алгоритм скрининга, диагностики, прогнозирования и мониторинга рака молочной железы на основании оценки статуса рецепторов эстрогена и прогестерона, биохимических показателей крови и ротовой жидкости, данных анатомической и молекулярной визуализации, профиля онкомаркеров, статуса прооксидантно-антиоксидантной системы и наличия генетически ассоциированных признаков исследуемой онкопатологии. Алгоритм позволяет обосновать дополнение стандартного перечня лабораторных исследований при РМЖ путем одновременного тестирования в крови и ротовой жидкости констелляции биохимических характеристик в рамках комбинированной диагностической панели, включающей как общеизвестные лабораторно-диагностические критерии РМЖ, так и новые эндогенные биохимические молекулярные паттерны.

Полученные результаты свидетельствуют, что исследование содержания ПТГрП в сыворотке крови и РЖ является потенциально возможным инструментом для раннего обнаружения онкопатологии молочной железы, что соответствует существующим в современной литературе представлениям о непосредственном участии этого мультипотентного белка в онкогенезе РМЖ и может предоставить потенциально значимую диагностическую и прогностическую информацию. Для оптимизации проведения лабораторного мониторинга, в частности в послеоперационном периоде для контроля ремиссии и рецидивирования, целесообразным является определение активности ЛДГ в ротовой жидкости.

Выводы

1. Установлено наличие статистически значимой корреляции активности ЛДГ ($r = 0,6058$, $p < 0,001$) и ЩФ ($r = 0,2430$, $p = 0,0245$) в периферической крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы. В смешанной слюне таких больных активность ЛДГ, ЩФ и аминотрансфераз увеличивается в большей степени, чем в крови, что особенно с учетом корреляции является ценным инструментом для лабораторного мониторинга.

2. Установлена ограниченная диагностическая ценность определения традиционных онкомаркеров (РЭА, СА125, СА15-3) в сыворотке крови у больных с впервые выявленным раком молочной железы. Более перспективным является анализ содержания ПТГрП, концентрация которого в сыворотке крови была увеличена на 22 % , а в ротовой жидкости в 2,2 раза ($r = 0,53$, $p = 0,0019$). На основании анализа ROC-кривых доказана высокая диагностическая эффективность использования ротовой жидкости в качестве неинвазивной платформы для скрининга: определение уровня СА125 в слюне обладает оптимальным балансом диагностической силы (показатель AUC = 0,88; специфичность 100 %, чувствительность 73 %), определение уровня ПТГрП в сыворотке крови характеризуется высокой воспроизводимостью и информативностью (показатель AUC = 0,82; специфичность 88 % , чувствительность 64 %).

3. Корреляционный анализ лабораторных показателей больных раком молочной железы подтвердил высокую информативность саливадиагностики функционального состояния системы антиоксидантной защиты. Изменения маркеров окислительного гомеостаза свидетельствовали о развитии окислительного стресса, а коэффициенты корреляции между показателями крови и смешанной слюны составили: для железо-восстанавливающей способности $r = 0,6082$ ($p = 0,0078$), антирадикальной активности $r = 0,5206$ ($p = 0,0090$), ТБК-реактивных продуктов $r = 0,3407$ ($p = 0,0430$), концентрации 8-OHdG $r = 0,4550$ ($p = 0,0215$).

4. Исследование мутации в генах BRCA1 и BRCA2 в качестве маркеров генетических признаков, ассоциированных с РМЖ показало в 100 % случаев

совпадение результатов исследования периферической венозной крови и ротовой жидкости.

5. Мутации в гене BRCA1 оказывают одно из ведущих влияний на развитие и выраженность окислительного стресса у больных раком молочной железы. Концентрация 8-OHdG в крови BRCA-положительных пациенток была на 38 % выше, ТБК-реактивных продуктов на 46 % выше, уровень антирадикальной активности на 62 % ниже, концентрация глутатиона на 22 % ниже в сравнении со значениями соответствующих показателей в подгруппе больных без мутаций в гене BRCA1. Выявленные особенности биохимических показателей крови и ротовой жидкости при раке молочной железы позволяют обосновать целесообразность персонифицированных диагностических подходов при данной патологии.

6. При исследовании особенностей нарушений окислительного гомеостаза у больных раком молочной железы у BRCA-положительных пациентов и больных без мутаций данного гена обнаруживаются статистически значимые различия маркеров крови, тогда как ротовая жидкость обладает существенно меньшим потенциалом для персонифицированной диагностики, хотя и позволяет установить окислительный стресс в сравнении с условной нормой, характерной для здоровых добровольцев.

7. На основании регрессионного анализа разработана математическая модель прогнозирования двухлетней выживаемости больных раком молочной железы. Определена оптимальная комбинация прогностических факторов, включающая генетический показатель и маркер антиоксидантного статуса. На основе данных факторов получено прогностическое уравнение: $X = -2,17 \times \text{МутацииBRCA1} + 7,14 \times \text{ОАОА}$, где наличие мутации в гене BRCA1 кодируется как «1», отсутствие – «0»; показатель ОАОА выражается в мМ аскорбиновой кислоты. Проведенный ROC-анализ подтвердил высокую чувствительность (94 %) и специфичность (88 %) разработанной модели. Значения коэффициента ниже 3,55 классифицируются как высокий риск летального исхода в течение двух лет.

Практические рекомендации

1. При проведении лабораторного мониторинга активности ЛДГ, ЩФ, маркеров окислительного гомеостаза, онкомаркеров, в особенности ПТГрП, у больных раком молочной железы возможно использование смешанной слюны в качестве биожидкости, диагностическая ценность которой равноценна периферической крови.

2. С целью лабораторного скрининга, диагностики, прогнозирования и мониторинга рака молочной железы целесообразно использовать алгоритм, основанный на определении биохимических показателей крови и ротовой жидкости, профиля онкомаркеров, статуса прооксидантно-антиоксидантной системы и генетически ассоциированных признаков исследуемой онкопатологии. Алгоритм позволяет обосновать дополнение стандартного перечня лабораторных исследований при РМЖ путем биохимического анализа состава ротовой жидкости. Внедрение в клинко-лабораторную практику предложенного алгоритма диагностических исследований позволит повысить эффективность раннего выявления рака молочной железы и качество ведения больных с этим заболеванием.

3. Для персонализированной стратификации больных и своевременной коррекции терапии больных с первично выявленным раком молочной железы целесообразно прогнозирование 2-летней выживаемости с использованием предложенной математической модели (чувствительность 94 % , специфичность 88 %): $X = -2,17 \times \text{МутацииBRCA1} + 7,14 \times \text{ОАОА}$, где наличие мутации в гене BRCA1 кодируется как «1», отсутствие – «0»; показатель ОАОА выражается в мМ аскорбиновой кислоты.

Значения коэффициента ниже 3,55 классифицируются как высокий риск летального исхода в течение двух лет.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Полученные в ходе диссертационного исследования результаты открывают ряд перспективных направлений для дальнейших фундаментальных и прикладных разработок в области молекулярной онкологии, биологической химии, молекулярной генетики и персонализированной терапии:

1. Разработка и валидация неинвазивных диагностических тест-систем на основе саливадиагностики. Учитывая стопроцентную конкордантность результатов детекции мутаций генов BRCA1 и BRCA2 в крови и ротовой жидкости, а также высокую диагностическую ценность саливарного CA125 (показатель AUC 0,88) и ПТГрП, перспективной задачей является создание мультимаркерных диагностических панелей на основе ротовой жидкости. Разработка стандартизированных тест-систем для неинвазивного скрининга РМЖ позволит существенно снизить лучевую и инвазивную нагрузку на пациенток, а также сделать массовый скрининг в группах высокого риска более доступным.

2. Лабораторный мониторинг эффективности терапии. Выявленная сильная корреляция активности ЛДГ и ЩФ в крови и слюне больных РМЖ обосновывает целесообразность проведения лонгитюдных исследований. Перспективным направлением является изучение динамики ферментативного профиля и маркеров окислительного стресса в ротовой жидкости в процессе химиотерапии, лучевой и таргетной терапии. Это позволит оценивать метаболический ответ опухоли на лечение, прогнозировать развитие резистентности и выявлять ранние признаки системной токсичности (например, кардио- и гепатотоксичности химиопрепаратов) неинвазивным способом.

3. Фундаментальные исследования связи мутаций гена BRCA1 и системного окислительного стресса. Обнаруженные выраженные различия в интенсивности свободнорадикальных процессов у BRCA-положительных и BRCA-отрицательных пациенток определяют направление фундаментальных исследований. Перспективным является изучение молекулярных путей,

связывающих дефекты репарации ДНК (обусловленные мутацией гена BRCA1) с митохондриальной дисфункцией и истощением пула глутатиона. Понимание этих механизмов позволит разработать новые схемы персонализированной антиоксидантной терапии для пациенток с наследственными формами РМЖ.

4. Цифровизация и масштабирование прогностической модели. Разработанное прогностическое уравнение двухлетней выживаемости, обладающее высокой чувствительностью и специфичностью, имеет высокий потенциал для клинического внедрения. Дальнейшая разработка темы предполагает: 1) валидацию данной математической модели в рамках многоцентровых клинических исследований на более крупных выборках пациенток; 2) интеграцию уравнения в цифровые системы поддержки принятия врачебных решений в виде программных модулей или мобильных приложений для практикующих онкологов, что позволит проводить автоматическую стратификацию больных по группам риска сразу при постановке диагноза; 3) модификацию модели путем включения дополнительных клинико-лабораторных параметров для прогнозирования пятилетней и десятилетней выживаемости.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АОА – общая антиоксидантная активность

АСТ – аспаратаминотрансфераза

АФК – активные формы кислорода

АФП – альфа-фетопротеин

ГГТ – гамма-глутамилтрансфераза

ГПО – глутатионпероксидаза

ГР – глутатионредуктаза

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТНБ – 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота)

ИФА – иммуноферментный анализ

КАТ – каталаза

КТ – компьютерная томография

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

МГ – маммография

МДА – малоновый диальдегид

миРНК – микроРНК

мМРТ – молекулярно-магнитно-резонансная томография

МРТ – магнитно-резонансная томография

нкРНК – некодирующая РНК

ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография

ПТгрП – паратиреоидный гормон-родственный протеин

ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография

РЖ – ротовая жидкость

РМЖ – рак молочной железы

РНК – рибонуклеиновая кислота

РЭА – раковый эмбриональный антиген

СА – опухолевый антиген

СОД – супероксиддисмутаза

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ТБКРП – вещества, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой

ТБЧ – тиобарбитуровое число

УЗИ – ультразвуковое исследование

цДНК – циркулирующая опухолевая днк

ЧСА – человеческий сывороточный альбумин

ЩФ – щелочная фосфатаза

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

8-OHdG – 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин

ABTS – 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфо кислота)

BCIOSS – интегральный коэффициент окислительного стресса при раке молочной железы

BRCA – ген рака молочной железы

CFS – бесклеточная слюна

DOR – отношение диагностических шансов

EGF – эпидермальный фактор роста

FDA – управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов

FRAP – железовосстанавливающий антиоксидант

FTIR – инфракрасная спектроскопия с преобразованием фурье

GSH – восстановленный глутатион

GSSG – окисленный глутатион

HER2 – рецептор эпидермального фактора роста человека 2

IgA – иммуноглобин А

IgG – иммуноглобулин G

LRP – белок резистентности легких

MCA – муциноподобный рако-ассоциированный антиген

MUC1 – муцин 1

NLR – отрицательное отношение правдоподобия

OLA1 – отрицательный ген-регулятор антиоксидантного клеточного ответа

PLR – положительное отношение правдоподобия

PR – рецепторы прогестерона

PTH1R – рецептор паратиреоидного гормона 1

ROC – рабочая характеристика приёмника

SBR – шкала Скарффа-Блума-Ричардсона

TPS – показатель доли опухоли

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Быков, И. М. Изменения биохимических показателей у больных с зависимостью от психостимуляторов на фоне метаболической коррекции / И. М. Быков, Д. А. Любченко, К. А. Попов // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2019. – Т. 14. – № 2. – С. 352–355.
2. Внутриопухолевая гетерогенность амплификации в her2/neu-положительных молекулярно-генетических подтипах рака молочной железы / Л. Н. Ващенко, Л. Э. Завалишина, И. А. Павленко, П. Е. Повилайтите // Сибирский научный медицинский журнал. – 2019. – Т. 39. – № 5. – С. 134–140.
3. Возможности применения генетических и сывороточных онкомаркеров при ранней диагностике рака молочной железы / Д. А. Рябчиков, И. А. Дудина, И. К. Воротников [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2018. – Т. 17. – № 1. – С. 14–22.
4. Жильчук, В. Е. К вопросу об информативности маркера Ca15-3 при раке молочной железы / В. Е. Жильчук // Онкология. – 2009. – Т. 11. – № 2. – С. 117–119.
5. Имянитов, Е. Н. Наследственный рак молочной железы / Е. Н. Имянитов // Практическая онкология. – 2010. – № 11. – С. 258–266.
6. Каприн, А. Д. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, Г. В. Петрова ; Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П. А. Герцена. – Москва : Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П. А. Герцена, 2017. – 250 с.
7. Киселев, В. И. Наследственный рак и современные возможности лекарственной коррекции генетических дефектов / В. И. Киселев, Е. Л. Муйжнек. – Москва, 2011. – С. 1–16.
8. Молекулярно-генетические исследования в практике онкологической клиники / Н. Е. Торопова, Е. В. Закамова, Ю. Ю. Тетерина [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2015. – Т. 17. – № 2-3. – С. 690–696.

9. Николенко, В. Н., Козлов С. В., Кочурова Е. В. Диагностическая значимость исследования ротовой жидкости в онкологии / В. Н. Николенко, С. В. Козлов, Е. В. Кочурова // Опухоли головы и шеи. – 2013. – № 1. – С. 39–42.

10. Особенности состояния маркеров окислительного стресса в смешанной слюне больных наркологического профиля: наблюдательное контролируемое исследование / Г. А. Ермакова, Е. С. Устинова, Д. А. Любченко [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2025. – Т. 32. – № 5. – С. 74–84.

11. Перспективы неинвазивной диагностики нарушений свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты при сахарном диабете 2 типа / И. М. Быков, К. И. Мелконян, Е. А. Алексеенко, К. А. Попов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 3-4. – С. 531–534.

12. Популяционный «портрет» рака молочной железы в России: анализ данных российского регистра / И. В. Поддубная, И. В. Колядина, Н. Д. Калашников [и др.] // Современная онкология. – 2015. – Т. 17. – № 1. – С. 25–29.

13. Потенциальная диагностическая ценность опухолевых маркеров слюны при раке молочной железы, легких и яичников: предварительное исследование / Л. В. Бельская, Е. А. Сарф, А. И. Логинова [и др.] // Актуальные проблемы молекулярной биологии. – 2023. – Т. 45. – № 6. – С. 5084–5098.

14. Роль наследственных факторов в патогенезе рака молочной железы / А. В. Пушкарев, К. В. Меньшиков, В. А. Пушкарев [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2020. – Т. 15. – № 2 (86). – С. 70–78.

15. Семиглазов, В. Ф., Семиглазов В. В. Скрининг рака молочной железы / В. Ф. Семиглазов, В. В. Семиглазов // Практическая онкология. – 2010. – Т. 11. – № 2. – С. 60–65.

16. Смирнова, Л. А. Ферритин и его клиническое значение / Л. А. Смирнова, С. П. Марцев // Медицинские новости. – 1996. – № 7. – С. 11–15.

17. Эффективность антиоксидантной коррекции у больных с хронической воспалительной болезнью матки и метаболическим синдромом /

Т. Г. Мелконьянц, И. М. Быков, К. А. Попов [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2020. – Т. 15. – № 4. – С. 535–538.

18. A New Look into Cancer-A Review on the Contribution of Vibrational Spectroscopy on Early Diagnosis and Surgery Guidance / A. P. Mamede, I. P. Santos, A. L. M. Batista de Carvalho [et al.] // *Cancers* (Basel). – 2021. – Vol. 13(21). – P. 5336.

19. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1 / Y. Miki, J. Swensen, D. Shattuck-Eidens [et al.] // *Science*. – 1994. – Vol. 266(5182). – P. 66–71.

20. A systematic review of health promotion interventions to increase breast cancer screening uptake: from the last 12 years / F. D. Agide, R. Sadeghi, G. Garmaroudi, B. M. Tigabu // *European Journal of Public Health*. – 2018. – Vol. 28(6). – P. 1149–1155.

21. Abnormal Galactosylated-Glycans recognized by *Bandeiraea Simplicifolia* Lectin I in saliva of patients with breast Cancer / J. Yang, X. Liu, J. Shu [et al.] // *Glycoconjugate Journal*. – 2020. – Vol. 37(3). – P. 373–394.

22. Al-Muhtaseb, S. I. Serum and saliva protein levels in females with breast cancer / S. I. Al-Muhtaseb // *Oncology Letters*. – 2014. – Vol. 8(6). – P. 2752–2756.

23. Ambrosone, C. B. Oxidants and antioxidants in breast cancer / C. B. Ambrosone // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2000. – Vol. 2(4). – P. 903–917.

24. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer / L. Harris, H. Fritsche, R. Mennel [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2007. – Vol. 25(33). – P. 5287–5312.

25. American Society of Clinical Oncology Policy Statement Update: Genetic and Genomic Testing for Cancer Susceptibility / M. E. Robson, A. R. Bradbury, B. Arun // *Journal of Clinical Oncology*. – 2015. – Vol. 33(31). – P. 3660–3667.

26. An evaluation of preoperative CA15-3 measurement in primary breast carcinoma / D. M. O'Hanlon, M. J. Kerin, P. Kent [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 1995. – Vol. 71(6). – P. 1288–1291.

27. Anderson, N. L. The clinical plasma proteome: a survey of clinical assays for proteins in plasma and serum / N. L. Anderson // *Clinical Chemistry*. – 2010. – Vol. 56(2). – P. 177–185.
28. Antioxidant capacity of human saliva and periodontal screening assessment in healthy adults / G. M. Tartaglia, N. Gagliano, L. Zarbin [et al.] // *Archives of Oral Biology*. – 2017. – Vol. 78. – P. 34–38.
29. Antioxidants for the Treatment of Breast Cancer: Are We There Yet? / C. Griñan-Lison, J. L. Blaya-Cánovas, A. López-Tejada [et al.] // *Antioxidants (Basel)*. – 2021. – Vol. 10(2). – P. 205.
30. Association between Oxidative Stress Parameters and Hematological Indices in Breast Cancer Patients / H. Danesh, N. Ziamajidi, S. A. Mesbah-Namin [et al.] // *International Journal of Breast Cancer*. – 2022. – Vol. 2022(1). – P. 1459410.
31. Association of Preoperative Serum Levels of CEA and CA15-3 with Molecular Subtypes of Breast Cancer / W. Zhao, X. Li, W. Wang [et al.] // *Disease Markers*. – 2021. – Vol. 2021(1). – P. 5529106.
32. Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis / I. C. C. Ferreira, E. M. G. Aguiar, A. T. F. Silva [et al.] // *Journal of Oncology*. – 2020. – Vol. 2020(1). – P. 4343590.
33. Bae, I. BRCA1 induces antioxidant gene expression and resistance to oxidative stress / I. Bae, S. Fan, Q. Meng // *Cancer Research*. – 2004. – Vol. 64(21). – P. 7893–7909.
34. Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins / A. Barth // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. – 2007. – Vol. 1767(9). – P. 1073–1101.
35. Bel'skaya, L. V. «Salivaomics» of Different Molecular Biological Subtypes of Breast Cancer / L. V. Bel'skaya, E. A. Sarf // *Current Issues in Molecular Biology*. – 2022. – Vol. 44(7). – P. 3053–3074.
36. Bel'skaya, L. V. The level of cytokines in saliva in breast cancer / L. V. Bel'skaya, V. K. Kosenok // *Вопросы онкологии*. – 2019. – Vol. 65. – P. 825–831.

37. Bel'skaya, L. V. Age and gender characteristics of the biochemical composition of saliva: Correlations with the composition of blood plasma / L. V. Bel'skaya, E. A. Sarf, V. K. Kosenok // *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. – 2020. – Vol. 10(2). – P. 59–65.
38. Bel'skaya, L. V. Diagnostic Value of Salivary Amino Acid Levels in Cancer / L. V. Bel'skaya, E. A. Sarf, A. I. Loginova // *Metabolites*. – 2023. – Vol. 13(8). – P. 950.
39. Bel'skaya, L. V. Indicators of L-arginine metabolism in saliva: A focus on breast cancer / L. V. Bel'skaya, E. A. Sarf, V. K. Kosenok // *Journal of Oral Biosciences*. – 2021. – Vol. 63(1). – P. 52–57.
40. Bel'skaya, L. V. The Role of Amino Acids in the Diagnosis, Risk Assessment, and Treatment of Breast Cancer: A Review / L. V. Bel'skaya, I. A. Gundyrev, D. V. Solomatin // *Current Issues in Molecular Biology*. – 2023. – Vol. 45(9). – P. 7513–7537.
41. Bioassay of saliva proteins: The best alternative for conventional methods in non-invasive diagnosis of cancer / A. Eftekhari, M. Hasanzadeh, S. Sharifi [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – Vol. 124. – P. 1246–1255.
42. Biochemical analysis of oral fluids for disease detection / Z. Khurshid, I. Warsi, S. F. Moin [et al.] // *Advances in Clinical Chemistry*. – 2021. – Vol. 100. – P. 205–253.
43. Bonne, N. J. Salivary biomarker development using genomic, proteomic and metabolomic approaches / N. J. Bonne, D. T. Wong // *Genome Medicine*. – 2012. – Vol. 4(10). – P. 82.
44. Boras-Granic, K. PTHrP and breast cancer: more than hypercalcemia and bone metastases / K. Boras-Granic, J. J. Wysolmerski // *Breast Cancer Research*. – 2012. – Vol. 14(2). – P. 307.
45. Boroumand M. Saliva, a bodily fluid with recognized and potential diagnostic applications / M. Boroumand, A. Olinas, T. Cabras // *Journal of Separation Science*. – 2021. – Vol. 44(19) – P. 3677–3690.

46. BRCA1 interacts with Smad3 and regulates Smad3-mediated TGF-beta signaling during oxidative stress responses / H. Li, M. Sekine, S. Seng [et al.] // PLoS One. – 2009. – Vol. 4(9). – P. e7091.
47. Breast cancer / N. Harbeck, F. Penault-Llorca, J. Cortes [et al.] // Nature Reviews Disease Primers. – 2019. – Vol. 5(1). – P. 66.
48. Breast cancer in the era of integrating "Omics" approaches / C. Rossi, I. Cicalini, M. C. Cufaro [et al.] // Oncogenesis. – 2022. – Vol. 11(1). – P. 17.
49. Breast Cancer Risk Genes – Association Analysis in More than 113,000 Women / L. Dorling, S. Carvalho, J. Allen [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2021. – Vol. 384(5). – P. 428–439.
50. Breast cancer risk is associated with the genes encoding the DNA double-strand break repair Mre11/Rad50/Nbs1 complex / H. M. Hsu, H. C. Wang, S. T. Chen [et al.] // Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. – 2007. – Vol. 16(10). – P. 2024–2032.
51. Breast cancer, screening and diagnostic tools: All you need to know / D. Barba, A. León-Sosa, P. Lugo [et al.] // Critical Reviews in Oncology/Hematology. – 2021. – Vol. 157. – P. 103174.
52. Bunaciu, A. A. Applications of FT-IR spectrophotometry in cancer diagnostics / A. A. Bunaciu, V. D. Hoang, H. Y. Aboul-Enein // Critical Reviews in Analytical Chemistry. – 2015. – Vol. 45(2). – P. 156–165.
53. CA27.29 as a tumour marker for risk evaluation and therapy monitoring in primary breast cancer patients / B. Rack, J. Jückstock, E. Trapp [et al.] // Tumor Biology. – 2016. – Vol. 37(10). – P. 13769–13775.
54. Calcium-sensing receptor promotes breast cancer by stimulating intracrine actions of parathyroid hormone-related protein / W. Kim, F. M. Takyar, K. Swan [et al.] // Cancer Research. – 2016. – Vol. 76(18). – P. 5348–5360.
55. Cancer Biomarkers in Liquid Biopsy for Early Detection of Breast Cancer: A Systematic Review / G. Duque, C. Manterola, T. Otzen [et al.] // Clinical Medicine Insights: Oncology. – 2022. – Vol. 16. – P. 11795549221134831.
56. Cancer Diagnostics via Ultrasensitive Multiplexed Detection of Parathyroid Hormone-Related Peptides with a Microfluidic Immunoarray / B. A. Otieno,

C. E. Krause, A. L. Jones [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2016. – Vol. 88(18). – P. 9269–9275.

57. Cancer statistics for the year 2020: An overview / J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2021. – Vol. 149(4). – P. 778–789.

58. Disposable inkjet-printed electrochemical platform for detection of clinically relevant HER-2 breast cancer biomarker / S. Carvajal, S. N. Fera, A. L. Jones [et al.] // *Biosensors & Bioelectronics*. – 2018. – Vol. 1. – №. 104. – P. 158–162.

59. Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy / C. Glorieux, N. Dejeans, B. Sid [et al.] // *Biochemical Pharmacology*. – 2011. – Vol. 82(10). – P. 1384–1390.

60. Characterization of RNA in saliva / N. J. Park, Y. Li, T. Yu [et al.] // *Clinical Chemistry*. – 2006. – Vol. 52(6). – P. 988–994.

61. Preoperative integrated oxidative stress score as a prognostic factor for predicting clinical outcomes in breast cancer patients received neoadjuvant chemotherapy: a real-world retrospective study / L. Chen, C. Dai, S. Peng [et al.] // *Int J Med Sci*. – 2025. – Vol. 22 (6). – P. 1437–1449.

62. Circulating oxidative stress parameters in pre- and post-menopausal healthy women and in women suffering from breast cancer treated or not with neoadjuvant chemotherapy / M. J. Ramírez-Expósito, E. Sánchez-López, C. Cueto-Ureña [et al.] // *Experimental Gerontology*. – 2014. – Vol. 58. – P. 34–42.

63. Clinical utility of tumour marker velocity of cancer antigen 15-3 (CA 15-3) and carcinoembryonic antigen (CEA) in breast cancer surveillance / J. X. Hing, C. W. Mok, P. T. Tan [et al.] // *Breast*. – 2020. – Vol. 52. – P. 95–101.

64. Clinical validity of saliva and novel technology for cancer detection / K. E. Kaczor-Urbanowicz, F. Wei, S. L. Rao [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. – Reviews on Cancer. – 2019. – Vol. 1872(1). – P. 49–59.

65. Clinicopathological and Prognostic Significance of Cancer Antigen 15-3 and Carcinoembryonic Antigen in Breast Cancer: A Meta-Analysis including 12,993 Patients / X. Li, D. Dai, B. Chen [et al.] // *Disease Markers*. – 2018. – Vol. 2018. – P. 9863092.

66. Comparative human salivary and plasma proteomes / J. A. Loo, W. Yan, P. Ramachandran, D. T. Wong // *Journal of Dental Research*. – 2010. – Vol. 89(10). – P. 1016–1023.
67. Comparative study on saliva proteins in patients and healthy individuals of brain tumours / A. W. R. Hamad, M. A. Ibrahim, S. I. Al-Mohtasib, K. N. Al-Kobasi // *Trends in Medical Research*. – 2009. – Vol. 4. – P. 16–23.
68. Comparison of breast cancer protein biomarker patterns in serum versus cell-free saliva / M. Hofner, Y. Gillitschka, C. Singer [et al.] // *Vienna : CCC-TRIO* 2023, 2023.
69. Comparison of the effectiveness of various sulphur-containing hepatoprotectors against chronic alcoholization / I. M. Bykov, H. P. Berberidy, K. A. Popov [et al.] // *Medical News of North Caucasus*. – 2019. – Vol. 14. – No. 3. – P. 523–527.
70. Comprehensive Review on Electrochemical Nano Biosensors for Precise Detection of Blood-Based Oncomarkers in Breast Cancer / M. Sadeghi, S. Sadeghi, S. M. Naghib, H. R. Garshasbi // *Biosensors*. – 2023. – Vol. 13(4). – P. 481.
71. Correlation between salivary and serum CA15-3 concentrations in patients with breast cancer / D. X. Assad, E. C. P. Mascarenhas, A. G. C. Normando [et al.] // *Molecular and Clinical Oncology*. – 2020. – Vol. 13(2). – P. 155–161.
72. BRCA2 germline mutations in male breast cancer cases and breast cancer families / F. J. Couch, L. M. Farid, M. L. DeShano [et al.] // *Nature Genetics*. – 1996. – Vol. 13. – №. 1. – P. 123–125.
73. Cristofanilli M. The use of liquid biopsy in early breast cancer: clinical evidence and future perspectives / P. D'Amico, C. Corvaja, L. Gerratana [et al.] // *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*. – 2021. – Vol. 7. – P. 3.
74. Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer / J. A. Beaver, D. Jelovac, S. Balukrishna [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2014. – Vol. 20(10). – P. 2643–2650.
75. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies / C. Bettgowda, M. Sausen, R. J. Leary [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2014. – Vol. 6(224). – P. 224ra24.

76. Determination of Salivary Sialic Acid Through Nanotechnology: A Useful Biomarker for the Screening of Breast Cancer / A. C. Hernández-Arteaga, J. de Jesús Zermeno-Nava, M. U. Martínez-Martínez [et al.] // Archives of Medical Research. – 2019. – Vol. 50(3). – P. 105–110.

77. Diagnosis of breast cancer by analysis of sialic acid concentrations in human saliva by surface-enhanced Raman spectroscopy of silver nanoparticles / A. Hernández-Arteaga, J. de Jesús Zermeno Nava, E. S. Kolosovas-Machuca [et al.] // Nano Research. – 2017. – Vol. 10(11). – P. 3662–3670.

78. Diagnostic accuracy of mammography, clinical examination, US, and MR imaging in preoperative assessment of breast cancer / W. A. Berg, L. Gutierrez, M. S. NessAiver [et al.] // Radiology. – 2004. – Vol. 233(3). – P. 830–849.

79. Diaz Jr, L. A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA / L. A. Diaz Jr., A. Bardelli // Journal of Clinical Oncology. – 2014. – Vol. 32(6). – P. 579–586.

80. Early detection of breast cancer using total biochemical analysis of peripheral blood components: a preliminary study / U. Zelig, E. Barlev, O. Bar [et al.] // BMC cancer. – 2015. – Vol. 15(1). – P. 408.

81. Easton, D. F. How many more breast cancer predisposition genes are there? / D. F. Easton // Breast Cancer Research. – 1999. – Vol. 1(1). – P. 14–17.

82. Effect of storage conditions on the extraction of PCR-quality genomic DNA from saliva / D. P. K. Ng, D. Koh, S. G. L. Choo [et al.] // Clinica Chimica Acta. – 2004. – Vol. 343(1-2). – P. 191–194.

83. Elkins, K. M. Rapid presumptive "fingerprinting" of body fluids and materials by ATR FT-IR spectroscopy / K. M. Elkins // Journal of Forensic Sciences. – 2011. – Vol. 56(6). – P. 1580–1587.

84. Emerging technologies for salivaomics in cancer detection / F. Garcia-Godoy, K. E. Kaczor-Urbanowicz, M. Tu [et al.] // Journal of Cellular and Molecular Medicine. – 2017. – Vol. 21(4). – P. 640–647.

85. Epidermal growth factor in plasma and saliva of patients with active breast cancer and breast cancer patients in follow-up compared with healthy women /

M. A. Navarro, R. Mesía, O. Díez-Gibert [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 1997. – Vol. 42(1). – P. 83–86.

86. ErbB-2 protein in sera and tumors of breast cancer patients / B. Breuer, S. Smith, A. Thor [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 1998. – Vol. 49(3). – P. 261–270.

87. Estrogen down-regulates uncoupling proteins and increases oxidative stress in breast cancer / J. Sastre-Serra, A. Valle, M. M. Company [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2010. – Vol. 48(4). – P. 506–512.

88. Evaluation of the diagnostic value of circulating tumor cells with CytoSorter® CTC capture system in patients with breast cancer / L. Jin, W. Zhao, J. Zhang [et al.] // *Cancer Medicine*. – 2020. – Vol. 9 (5). – P. 1638–1647.

89. Expression and significance of ER, PR, VEGF, CA15-3, CA125 and CEA in judging the prognosis of breast cancer / S. J. Zhang, Y. Hu, H. L. Qian [et al.] // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. – 2013. – Vol. 14(6). – P. 3937–3940.

90. Expression of the receptor for parathyroid hormone-related protein in normal and malignant breast tissue / S. E. Downey, J. Hoyland, A. J. Freemont [et al.] // *Journal of Pathology*. – 1997. – Vol. 183(2). – P. 212–217.

91. Fábíán, T. K. Saliva in Health and Disease / T. K. Fábíán, P. Fejérdy, P. Csermely // *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. – Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc, 2008. – Vol. 4. – P. 1–9.

92. Feunteun, J. Breast cancer and genetic instability: the molecules behind the scenes / J. Feunteun // *Molecular Medicine Today*. – 1998. – Vol. 4(6). – P. 263–267.

93. Fu, Y. Assessing Clinical Significance of Serum CA15-3 and Carcinoembryonic Antigen (CEA) Levels in Breast Cancer Patients: A Meta-Analysis / Y. Fu, H. Li // *Medical Science Monitor*. – 2016. – Vol. 22. – P. 3154–3162.

94. Genome-wide association analysis identifies three new breast cancer susceptibility loci / M. Ghoussaini, O. Fletcher, K. Michailidou [et al.] // *Nature Genetics*. – 2012. – Vol. 44 (3). – P. 312–318.

95. Ginsburg, G. S. Precision Medicine: From Science To Value / G. S. Ginsburg, K. A. Phillips // *Health Affairs (Millwood)*. – 2018. – Vol. 37(5). – P. 694–701.

96. Giri, K. Targeted proteomics using parallel reaction monitoring confirms salivary proteins indicative of metastatic triple-negative breast cancer / K. Giri, S. Maity, K. Ambatipudi // *Journal of Proteomics*. – 2022. – Vol. 267. – P. 104701.
97. Global guidelines for breast cancer screening: A systematic review / W. Ren, M. Chen, Y. Qiao, F. Zhao // *Breast*. – 2022. – Vol. 64. – P. 85–99.
98. Hasan, D. Diagnostic impact of CEA and CA15-3 on chemotherapy monitoring of breast cancer patients / D. Hasan // *Journal of Circulating Biomarkers*. – 2022. – Vol. 11. – P. 57–63.
99. Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (review) / H. Kobayashi, S. Ohno, Y. Sasaki, M. Matsuura // *Oncology Reports*. – 2013. – Vol. 30(3). – P. 1019–1029.
100. Hereditary cancer syndromes / E. N. Imyanitov, E. S. Kuligina, A. P. Sokolenko [et al.] // *World Journal of Clinical Oncology*. – 2023. – Vol. 14(2). – P. 40–68.
101. High and differential expression of HER2/neu extracellular domain in bilateral ductal fluids from women with unilateral invasive breast cancer / H. M. Kuerer, P. A. Thompson, S. Krishnamurthy [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2003. – Vol. 9. – P. 601–605.
102. Homologous carcinomas of the breasts, skin, and salivary glands. A histologic and immunohistochemical comparison of ductal mammary carcinoma, ductal sweat gland carcinoma and salivary duct carcinoma / M. R. Wick, D. M. Ockner, S. E. Mills [et al.] // *American Journal of Clinical Pathology*. – 1998. – Vol. 109(1). – P. 75–84.
103. Human saliva as a diagnostic material / S. Chojnowska, T. Baran, I. Wilińska [et al.] // *Advances in Medical Sciences*. – 2018. – Vol. 63(1). – P. 185–191.
104. Ialongo, C. Preanalytic of total antioxidant capacity assays performed in serum, plasma, urine and saliva / C. Ialongo // *Clinical Biochemistry*. – 2017. – Vol. 50(6). – P. 356–363.
105. Identification of early biomarkers in saliva in genetically engineered mouse model C (3)1-TAg of breast cancer / I. F. Gilson Sena, L. L. Fernandes, L. L. Lorandi [et al.] // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12(1). – P. 11544.

106. Implications of free radicals and antioxidant levels in carcinoma of the breast: A never-ending battle for survival / R. J. Sinha, R. Singh, S. Mehrotra, R. K. Singh // *Indian Journal of Cancer*. – 2009. – Vol. 46(2). – P. 146–150.
107. Importance of CEA and CA15-3 during disease progression in metastatic breast cancer patients / D. Laessig, D. Nagel, V. Heinemann [et al.] // *Anticancer Research*. – 2007. – Vol. 27(4A). – P. 1963–1968.
108. Influencing factors for saliva urea and its application in chronic kidney disease / C. Peng, Y. Xia, Y. Wu [et al.] // *Clinical Biochemistry*. – 2013. – Vol. 46(3). – P. 275–277.
109. Interactions between oxidative stress, lipid profile and antioxidants in breast cancer: a case control study / R. K. Gupta, A. K. Patel, R. Kumari [et al.] // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. – 2012. – Vol. 13(12). – P. 6295–6298.
110. Investigation of potential salivary biomarkers for the diagnosis of breast cancer / H. Jinno, T. Murata, M. Sunamura, M. Sugimoto // *Journal of Clinical Oncology*. – 2015. – Vol. 33(28). – P. 145–145.
111. Iqbal, N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications / N. Iqbal, N. Iqbal // *Molecular Biology International*. – 2014. – Vol. 2014(1). – P. 852748.
112. Is parathyroid hormone-related protein a sensitive serum marker in advanced breast cancer? / C. M. Pyke, G. Menezes, D. M. Purdie [et al.] // *Australian and New Zealand Journal of Surgery*. – 1997. – Vol. 67(5). – P. 256–259.
113. Jeschke, U. Can We Find Breast Cancer via Salivary Fluid Glycosylation Analyses? / U. Jeschke // *EBioMedicine*. – 2018. – Vol. 28. – P. 4.
114. Johnson, R. W. Parathyroid hormone-related protein in breast cancer bone metastasis / R. W. Johnson, J. Rhoades, T. J. Martin // *Vitamins and Hormones*. – 2022. – Vol. 120. – P. 215–230.
115. Kane, J. F. Re-Evaluating the Role of PTHrP in Breast Cancer / J. F. Kane, R. W. Johnson // *Cancers (Basel)*. – 2023. – Vol. 15(10). – P. 2670.
116. Knockdown of OLA1, a regulator of oxidative stress response, inhibits motility and invasion of breast cancer cells / J. Zhang, V. Rubio, S. Zheng, Z. Shi // *Journal of Zhejiang University Science B*. – 2009. – Vol. 10 (11). – P. 796–804.

117. Kumar, P. D. M. Salivary human epidermal growth factor receptors 2 levels in patients with different stages of breast cancer: A cross-sectional study / P. D. M. Kumar, S. Kandavel // *Journal of Global Oncology*. – 2018. – Vol. 4 (Suppl. 2). – P. 55s.
118. Lau, C. S. Breast cancer exosome-like microvesicles and salivary gland cells interplay alters salivary gland cell-derived exosome-like microvesicles in vitro / C. S. Lau, D. T. W. Wong // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7(3). – P. e33037.
119. Le CA 125 dans le bilan d'extension des cancers du sein nouvellement diagnostiqués: pourquoi et comment? / A. Laffont, V. Goussot, A. Berriolo-Riedinger, J. M. Riedinger // *Annales de Biologie Clinique (Paris)*. – 2018. – Vol. 76(5). – P. 553–561.
120. Level of Expression of Parathyroid Hormone Related Protein and its Receptor in Human Breast Cancer and its Correlation with the Clinical Outcome / M. K. Zia, K. A. Rmali, R. E. Mansel [et al.] // *International Journal of Cancer Research*. – 2007. – Vol. 3. – P. 92–102.
121. Liou, G. Y. Reactive oxygen species in cancer / G. Y. Liou, P. Storz // *Free Radical Research*. – 2010. – Vol. 44(5). – P. 479–496.
122. Lipid peroxidation and antioxidant status in blood and tissue of malignant breast tumor and benign breast disease / A. Gönenç, D. Erten, S. Aslan [et al.] // *Cell Biology International*. – 2006. – Vol. 30[4]. – P. 376–380.
123. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer / C. P. Rajneesh, A. Manimaran, K. R. Sasikala, P. Adaikappan // *Singapore Medical Journal*. – 2008. – Vol. 49(8). – P. 640–643.
124. Liquid Biopsy as novel Tool in Precision Medicine: Origins, Properties, Identification and Clinical Perspective of Cancer's Biomarkers / D. Fernández-Lázaro, J. L. García Hernández, A. C. García [et al.] // *Diagnostics (Basel)*. – 2020. – Vol. 10(4). – P. 215.
125. Liquid Biopsy in Oral Cancer / F. Lousada-Fernandez, O. Rapado-Gonzalez, J. L. Lopez-Cedrun [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19(6). – P. 1704.

126. Localization of human BRCA1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas / C. A. Wilson, L. Ramos, M. R. Villaseñor [et al.] // *Nature Genetics*. – 1999. – Vol. 21(2). – P. 236–240.
127. Ludwig, J. A. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection / J. A. Ludwig, J. N. Weinstein // *Nature Reviews Cancer*. – 2005. – Vol. 5(11). – P. 845–856.
128. Malamud, D. Saliva as a diagnostic fluid / D. Malamud // *Dental Clinics of North America*. – 2011. – Vol. 55(1). – P. 159–178.
129. Marks, J. R. Refining the role of BRCA1 in combating oxidative stress / J. R. Marks // *Breast Cancer Research*. – 2013. – Vol. 15(6). – P. 320.
130. Martin, T. J. Multiple actions of parathyroid hormone-related protein in breast cancer bone metastasis / T. J. Martin, R. W. Johnson // *British Journal of Pharmacology*. – 2021. – Vol. 178(9). – P. 1923–1935.
131. Measurement of HER2 in saliva of women in risk of breast cancer / D. de Abreu Pereira, V. R. Areias, M. F. Franco [et al.] // *Pathology & Oncology Research*. – 2013. – Vol. 19(3). – P. 509–513.
132. Metabolic Features of Saliva in Breast Cancer Patients / L. V. Bel'skaya, E. A. Sarf, D. V. Solomatin, V. K. Kosenok // *Metabolites*. – 2022. – Vol. 12(2). – P. 166.
133. MicroRNA-10b expression in breast cancer and its clinical association / J. Zhang, J. Yang, X. Zhang [et al.] // *PLoS One*. – 2018. – Vol. 13(2). – P. e0192509.
134. Mobile 5P-Medicine Approach for Cardiovascular Patients / I. M. Pires, H. V. Denysyuk, M. V. Villasana [et al.] // *Sensors (Basel)*. – 2021. – Vol. 21(21). – P. 6986.
135. Molecular markers for breast cancer: prediction on tumor behavior / B. K. Banin Hirata, J. M. M. Oda, R. Losi Guembarovski // *Disease Markers*. – 2014. – Vol. 2014(1). – P. 513158.
136. Monitoring breast cancer treatment using a Fourier transform infrared spectroscopy-based computational model / J. Depciuch, E. Kaznowska, S. Golowski [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2017. – Vol. 143. – P. 261–268.

137. MUC3 and MCA serum levels and steroid receptor content in breast cancer / M. Quaranta, M. Coviello, A. Daniele [et al.] // *International Journal of Biological Markers*. – 2004. – Vol. 19(2). – P. 109–114.
138. Nonaka, T. Liquid Biopsy in Head and Neck Cancer: Promises and Challenges / T. Nonaka, D. T. W. Wong // *Journal of Dental Research*. – 2018. – Vol. 97(6). – P. 701–708.
139. Nonaka, T. Saliva Diagnostics / T. Nonaka, D. T. W. Wong // *Annual Review of Analytical Chemistry (Palo Alto Calif)*. – 2022. – Vol. 15(1). – P. 107–121.
140. New Approach for the Diagnosis of Systemic and Oral Diseases Based on Salivary Biomolecules / A. Roi, L. C. Rusu, C. I. Roi [et al.] // *Disease Markers*. – 2019. – Vol. 2019(1). – P. 8761860.
141. Non-invasive proteomics-thinking about personalized breast cancer screening and treatment / M. Debold, M. Wolfgarten, G. Walgenbach-Brünagel [et al.] // *EPMA Journal*. – 2010. – Vol. 1(3). – P. 413-420.
142. Noskov, V. B. Saliva in clinical laboratory diagnosis (a review of literature) / V. B. Noskov // *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. – 2008. – Vol. 6. – P. 14–17.
143. Oxidant/Antioxidant Status of Breast Cancer Patients in Pre- and Post-Operative Periods / J. Didžiapetrienė, B. Kazbarienė, R. Tikuišis [et al.] // *Medicina (Kaunas)*. – 2020. – Vol. 56(2). – P. 70.
144. Oxidant/antioxidant status, lipids and hormonal profile in overweight women with breast cancer / N. Badid, F. Z. Ahmed, H. Merzouk [et al.] // *Pathology & Oncology Research*. – 2010. – Vol. 16(2). – P. 159–167.
145. Oxidative stress markers in saliva and plasma differ between diet-controlled and insulin-controlled gestational diabetes mellitus / A. Zygula, P. Kosinski, A. Zwierzchowska [et al.] // *Diabetes Research and Clinical Practice*. – 2019. – Vol. 148. – P. 72–80.
146. Parathyroid hormone-related protein expression, in combination with nodal status, predicts bone metastasis and prognosis of breast cancer patients / K. Takagaki, T. Takashima, N. Onoda [et al.] // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2012. – Vol. 3(6). – P. 963–968.

147. Parathyroid hormone-related protein in patients with primary breast cancer and eucalcemia / E. Bucht, H. Rong, Y. Pernow [et al.] // *Cancer Research*. – 1998. – Vol. 58(18). – P. 4113–4116.

148. Parathyroid hormone-related protein localization in breast cancers predict improved prognosis / M. A. Henderson, J. A. Danks, J. L. Slavin [et al.] // *Cancer Research*. – 2006. – Vol. 66(4). – P. 2250–2256.

149. Parathyroid Hormone-Related Protein Protects against Mammary Tumor Emergence and Is Associated with Monocyte Infiltration in Ductal Carcinoma In situ / N. I. Fleming, M. K. Trivett, J. George [et. Al] // *Cancer Research*. – 2009. – Vol. 69(18). – P. 7473–7479.

150. Parathyroid hormone-related protein: elevated levels in both humoral hypercalcemia of malignancy and hypercalcemia complicating metastatic breast cancer / V. Grill, P. Ho, J. J. Body [et al.] // *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 1991. – Vol. 73(6). – P. 1309–1315.

151. Peculiarities of evaluation of the oral fluid antioxidant activity in patients with local or systemic diseases / K. Popov, N. Bykova, O. Shvets [et al.] // *Georgian Medical News*. – 2021. – No. 311. – P. 68–73.

152. Pivotal evaluation of the accuracy of a biomarker used for classification or prediction: standards for study design / M. S. Pepe, Z. Feng, H. Janes [et al.] // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2008. – Vol. 100(20). – P. 1432–1438.

153. Plasma Proteome Signature to Predict the Outcome of Breast Cancer Patients Receiving Neoadjuvant Chemotherapy / S. Gwark, H. S. Ahn, J. Yeom [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2021. – Vol. 13(24). – P. 6267.

154. Prediction of breast cancer risk based on profiling with common genetic variants / N. Mavaddat, P. D. P. Pharoah, K. Michailidou [et al.] // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2015. – Vol. 107(5). – P. djv036.

155. Prevalence of CA 27.29 in primary breast cancer patients before the start of systemic treatment / B. Rack, C. Schindlbeck, J. Jueckstock [et al.] // *Anticancer Research*. – 2010. – Vol. 30(5). – P. 1837–1841.

156. Profile of tumor-associated cytokines in breast cancer patients: A preliminary study / C. F. Streckfus, N. Nwizu, C. G. Streckfus, D. Arreola // *Journal of Cancer Science and Clinical Oncology*. – 2018. – Vol. 5(2). – P. 206–218.

157. Prognostic role of apoptotic, Bcl-2, c-erbB-2, and p53 tumor markers in salivary gland / R. M. Nagler, H. Kerner, S. Ben-Eliezer [et al.] // *Oncology*. – 2003. – Vol. 64. – P. 389–398.

158. Prognostic value of immunocytochemical determination of parathyroid hormone-related peptide expression in cells of mammary ductal carcinoma. Analysis of 7 years of the disease course / P. Surowiak, P. Dzięgiel, R. Matkowski [et al.] // *Virchows Archiv*. – 2003. – Vol. 442(3). – P. 245–251.

159. Promising applications of human-derived saliva biomarker testing in clinical diagnostics / M. Song, H. Bai, P. Zhang [et al.] // *International Journal of Oral Science*. – 2023. – Vol. 15(1). – P. 2.

160. Proteomic profile of saliva and plasma from women with impalpable breast lesions / L. Delmonico, M. Bravo, R. T. Silvestre [et al.] // *Oncology Letters*. – 2016. – Vol. 12(3). – P. 2145–2152.

161. Proteomics of saliva: personal experience / E. Scarano, A. Fiorita, P. M. Picciotti [et al.] // *Acta Otorhinolaryngologica Italica*. – 2010. – Vol. 30(3). – P. 125–130.

162. PTHrP induces STAT5 activation, secretory differentiation and accelerates mammary tumor development / D. Y. Grinman, K. Boras-Granic, F. M. Takyar [et al.] // *Breast Cancer Research*. – 2022. – Vol. 24(1). – P. 30.

163. Quality and quantity of saliva DNA obtained from the self-administrated oragene method-a pilot study on the cohort of Swedish men / T. Rylander-Rudqvist, N. Hakansson, G. Tybring, A. Wolk // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. – 2006. – Vol. 15(9). – P. 1742–1745.

164. Rare, evolutionarily unlikely missense substitutions in CHEK2 contribute to breast cancer susceptibility: results from a breast cancer family registry case-control mutation-screening study / F. Le Calvez-Kelm, F. Lesueur, F. Damiola [et al.] // *Breast Cancer Research*. – 2011. – Vol. 13(1). – P. R6.

165. Relationship between tumor markers CEA and CA 15-3, TNM staging, estrogen receptor rate and MIB-1 index in patients with pT1-2 breast cancer / F. Lumachi, S. M. M. Basso, A. A. Brandes [et al.] // *Anticancer Research*. – 2004. – Vol. 24(5B). – P. 3221–3224.

166. Rossiello, R. Distribution of ferritin, transferrin and lactoferrin in breast carcinoma tissue / R. Rossiello, M. V. Carriero, G. G. Giordano // *Journal of Clinical Pathology*. – 1984. – Vol. 37(1). – P. 51–55.

167. Saha, T. BRCA1 down-regulates cellular levels of reactive oxygen species / T. Saha, J. K. Rih, E. M. Rosen // *FEBS Letters*. – 2009. – Vol. 583(9). – P. 1535–1543.

168. Saliva samples are a viable alternative to blood samples as a source of DNA for high throughput genotyping / J. E. Abraham, M. J. Maranian, I. Spiteri [et al.] // *BMC Medical Genomics*. – 2012. – Vol. 5(1). – P. 19.

169. Saliva samples as a source of DNA for high throughput genotyping: an acceptable and sufficient means in improvement of risk estimation throughout mammographic diagnostics / U. G. Poehls, C. C. Hack, A. B. Ekici [et al.] // *European Journal of Medical Research*. – 2018. – Vol. 23 (1). – P. 20.

170. Saliva a new opportunity for fluid biopsy / Z. Huang, X. Yang, Y. Huang [et al.] // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. – 2023. – Vol. 61 (1). – P. 4–32.

171. Salivary biomarkers in breast cancer diagnosis: A systematic review and diagnostic meta-analysis / M. Koopaie, S. Kolahdooz, M. Fatahzadeh, S. Manifar // *Cancer Medicine*. – 2022. – Vol. 11(13). – P. 2644–2661.

172. Salivary biomarkers in the diagnosis of breast cancer: A review / E. C. Porto-Mascarenhas, D. X. Assad, H. Chardin [et al.] // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. – 2017. – Vol. 110. – P. 62–73.

173. Salivary Biomarkers to Assess Breast Cancer Diagnosis and Progression: Are We There Yet? / C. F. Streckfus, L. Bigler, T. Dellinger [et al.] // Gokul S. (ed.) *Saliva and Salivary Diagnostics*. – London : IntechOpen, 2019.

174. Salivary Gland Function, Antioxidant Defence and Oxidative Damage in the Saliva of Patients with Breast Cancer: Does the BRCA1 Mutation Disturb

the Salivary Redox Profile? / B. Sawczuk, M. Maciejczyk, M. Sawczuk-Siemieniuk // *Cancers (Basel)*. – 2019. – Vol. 11(10). – P. 1501.

175. Salivary Glycopatterns as Potential Biomarkers for Screening of Early-Stage Breast Cancer / X. Liu, H. Yu, Y. Qiao // *EBioMedicine*. – 2018. – Vol. 28. – P. 70–79.

176. Salivary metabolites to detect patients with cancer: a systematic review / D. X. Assad, E. C. P. Mascarenhas, C. L. de Lima // *International Journal of Clinical Oncology*. – 2020. – Vol. 25(6). – P. 1016–1036.

177. Salivary Metabolomics for Diagnosis and Monitoring Diseases: Challenges and Possibilities / E. Hyvärinen, M. Savolainen, J. J. W. Mikkonen, A. M. Kullaa // *Metabolites*. – 2021. – Vol. 11(9). – P. 587.

178. Salivary metabolomics with alternative decision tree-based machine learning methods for breast cancer discrimination / T. Murata, T. Yanagisawa, T. Kurihara [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2019. – Vol. 177(3). – P. 591–601.

179. Salivary miRNA-21 expression as a potential non-invasive diagnostic biomarker in breast cancer / M. Koopaie, F. Abedinejad, S. Manifar [et al.] // *Gene Reports*. – 2021. – Vol. 25. – P. 101317.

180. Salivary protein factors are elevated in breast cancer patients / M. N. Brooks, J. Wang, Y. Li [et al.] // *Molecular Medicine Reports*. – 2008. – Vol. 1(3). – P. 375–378.

181. Screening and genetic counselling for relatives of patients with breast cancer in a family cancer clinic / R. S. Houlston, L. Lemoine, E. McCarter [et al.] // *Journal of Medical Genetics*. – 1992. – Vol. 29(10). – P. 691–694.

182. Serum HER2 in combination with CA15-3 as a parameter for prognosis in patients with early breast cancer / D. Di Gioia, M. Dresse, D. Mayr [et al.] // *Clinica Chimica Acta*. – 2015. – Vol. 440. – P. 16–22.

183. Serum markers and prognosis in locally advanced breast cancer / J. Martínez-Trufero, A. R. de Lobera, J. Lao [et al.] // *Tumori*. – 2005. – Vol. 91(6). – P. 522–530.

184. Serum Oxidative Stress Markers and Genotoxic Profile Induced by Chemotherapy in Patients with Breast Cancer: A Pilot Study / A. L. G. Júnior, M. F. C. J. Paz, L. I. S. Silva [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2015. – Vol. 2015(1). – P. 212964.
185. Serum protein profiling for diagnosis of breast cancer using SELDI-TOF MS / M. C. W. Gast, C. H. Van Gils, L. F. A. Wessels [et al.] // *Oncology Reports*. – 2009. – Vol. 22(1). – P. 205–213.
186. Sharma, R. Breast cancer incidence, mortality and mortality-to-incidence ratio (MIR) are associated with human development, 1990-2016: evidence from Global Burden of Disease Study 2016 / R. Sharma // *Breast Cancer*. – 2019. – Vol. 26(4). – P. 428–445.
187. Significance of serum carcinoembryonic antigen in metastatic breast cancer patients: A prospective / T. M. Anoop, P. R. Joseph, S. Soman [et al.] // *World Journal of Clinical Oncology*. – 2022. – Vol. 13(6). – P. 529–539.
188. Splicing Factor Transcript Abundance in Saliva as a Diagnostic Tool for Breast Cancer / M. Bentata, G. Morgenstern, Y. Nevo [et al.] // *Genes*. – 2020. – Vol. 11(8). – P. 880.
189. Strategies for five tumour markers in the screening and diagnosis of female breast cancer / J. Luo, J. Xiao, Y. Yang [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2023. – Vol. 12. – P. 1055855.
190. Streckfus, C. A catalogue of altered salivary proteins secondary to invasive ductal carcinoma: A novel in vivo paradigm to assess breast cancer progression / C. F. Streckfus, L. Bigler // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6(1). – P. 30800 (1–18).
191. Streckfus, C. F. The use of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to detect putative breast cancer markers in saliva: a feasibility study / C. F. Streckfus, L. R. Bigler, M. Zwick // *Journal of Oral Pathology & Medicine*. – 2006. – Vol. 35(5). – P. 292–300.
192. Sung, H. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel [et al.] // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. – 2021. – Vol. 71. – No. 3. – P. 209–249.

193. Systematic comparison of the human saliva and plasma proteomes. Proteomics / W. Yan, R. Apweiler, B. M. Balgley [et al.] // Proteomics-clinical applications.– 2009. – Vol. 3(1). – P. 116–134.
194. Tabak, L. A. Dental, oral, and craniofacial research: the view from the NIDCR / L. A. Tabak // Journal of Dental Research. – 2004. – Vol. 83(3). – P. 196–197.
195. The landscape of microRNA, Piwi-interacting RNA, and circular RNA in human saliva / J. H. Bahn, Q. Zhang, F. Li [et al.] // Clinical Chemistry. – 2015. – Vol. 61(1). – P. 221–230.
196. The potential use of saliva to detect recurrence of disease in women with breast carcinoma / L. R. Bigler, C. F. Streckfus, L. Copeland [et al.] // Journal of Oral Pathology & Medicine. – 2002. – Vol. 31(7). – P. 421–431.
197. The presence of soluble c-erbB-2 in saliva and serum among women with breast carcinoma: a preliminary study / C. Streckfus, L. Bigler, T. Dellinger [et al.] // Clinical Cancer Research. – 2000. – Vol. 6 (6). – P. 2363–2370.
198. The relative potency of a human tumor-derived PTH-like adenylate cyclase-stimulating preparation in three bioassays / A. F. Stewart, T. Wu, W.J. Burtis [et al.] // Journal of Bone and Mineral Research. – 1987. – Vol. 2(1). – P. 37–43.
199. The Role of Oxidative Stress Modulators in Breast Cancer / H. Gurer-Orhan, E. Ince, D. Konyar [et al.] // Current Medicinal Chemistry. – 2018. – Vol. 25(33). – P. 4084–4101.
200. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy / F. Hecht, C. F. Pessoa, L. B. Gentile [et al.] // Tumor Biology. – 2016. – Vol. 37(4). – P. 4281–4291.
201. The utilization of saliva as an early diagnostic tool for oral cancer: microRNA as a biomarker / J. S. Ghizoni, R. Nichele, M. T. De Oliveira [et al.] // Clinical and Translational Oncology. – 2020. – Vol. 22(6). – P. 804–812.
202. TP53 abnormalities and genetic instability in breast cancer / J.E. Eyfjörd, S. Thorlacius, R. Valgardsdottir [et al.] // Acta Oncologica. – 1995. – Vol. 34(5). – P. 663–667.

203. Tumor markers in breast cancer--evaluation of their clinical usefulness / P. Marić, P. Ozretić, S. Levanat [et al.] // Collegium Antropologicum. – 2011. – Vol. 35(1). – P. 241–247.
204. Tumor Markers of Breast Cancer: Role in Early Diagnosis, Monitoring Response to Therapy and Determination of Prognosis / A. M. Kabel, A. H. Al-shehri, B. S. Madani [et al.] // Journal of Cancer Research and Treatment. – 2016. – Vol. 4(5). – P. 80–87.
205. Tumor-derived exosomes and microvesicles in head and neck cancer: implications for tumor biology and biomarker discovery / S. Principe, A. B. Y. Hui, J. Bruce [et al.] // Proteomics. – 2013. – Vol. 13(10–11). – P. 1608–1623.
206. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women with Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline / L. N. Harris, N. Ismaila, L. M. McShane [et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 2016. – Vol. 34(10). – P. 1134–1150.
207. Usefulness of salivary and serum auto-antibodies against tumor biomarkers HER2 and MUC1 in breast cancer screening / F. Laidi, A. Bouziane, A. Errachid, F. Zaoui // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. – 2016. – Vol. 17(1). – P. 335–339.
208. Using saliva secretions to model disease progression / C. F. Streckfus, L. Bigler, C. Edwards [et al.] // Advances in Saliva Diagnostics. – 2015. – P. 187–198.
209. Vascular endothelial growth factor levels in relation to oxidative damage and antioxidant status in patients with breast cancer / D. Pande, R. Negi, S. Khanna [et al.] // Journal of Breast Cancer. – 2011. – Vol. 14 (3) – P. 181–184.
210. Wong, D. T. Salivaomics / D. T. W. Wong // Journal of the American Dental Association. – 2012. – Vol. 143. – P. 19S–24S.
211. Wong, D. T. Salivary diagnostics: scientific and clinical frontiers / D. T. W. Wong // Advances in Dental Research. – 2011. – Vol. 23(4). – P. 350–352.
212. Wood, N. The expression of lung resistance protein in saliva: a novel prognostic indicator protein for carcinoma of the breast / N. Wood, C. F. Streckfus // Cancer Investigation. – 2015. – Vol. 33(10). – P. 510–515.
213. Yi, Y. W. BRCA1 and Oxidative Stress / Y. W. Yi, H. J. Kang, I. Bae // Cancers. – 2014. – Vol. 6. (2). – P. 771–795.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Таблица 1. Биомаркеры рака молочной железы, определяемые в периферической крови	22
Таблица 2. Онкомаркеры рака молочной железы в ротовой жидкости	30
Рисунок 1. Предполагаемый путь раковых экзосом из рака молочной железы в ротовую жидкость	35
Таблица 3. Распределение больных основной группы по гистологической степени злокачественности опухоли (G)	52
Таблица 4. Суррогатное определение молекулярно-биологических подтипов рака молочной железы у больных основной группы	53
Формула 1. Расчет способности радикальной сорбции	60
Формула 2. Расчет тиобарбитурового числа ротовой жидкости	62
Таблица 5. Значения лабораторных маркеров белкового обмена в сыворотке крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы (Me(p0,25/p0,75))	68
Формула 3. Расчет интегральной оценки окислительного стресса	69
Таблица 6. Значения лабораторных маркеров углеводного и липидного обмена в сыворотке крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы (Me(p0,25/p0,75))	70
Таблица 7. Значения лабораторных маркеров электролитного обмена в сыворотке крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы (Me(p0,25/p0,75))	71
Таблица 8. Значения активности ферментов в сыворотке крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы (Me(p0,25/p0,75))	72
Таблица 9. Значения некоторых онкомаркеров в сыворотке крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы (Me(p0,25/p0,75))	75
Рисунок 2. Концентрация паратгормон-родственного протеина в сыворотке крови больных раком молочной железы (Me(p0,25/p0,75))	76

Рисунок 3. Концентрация паратгормон-родственного протеина в ротовой жидкости крови больных раком молочной железы (Me(p0,25/p0,75))	77
Таблица 10. Значения биохимических показателей в сыворотке крови и ротовой жидкости женщин с высоким риском развития рака молочной железы (Me(p0,25/p0,75))	79
Рисунок 4. ROC-кривые содержания онкомаркеров в ротовой жидкости испытуемых лиц подгрупп больных раком молочной железы и их здоровых родственников	82
Рисунок 5. Концентрация продуктов оксидативных модификаций биомолекул в эритроцитарной взвеси и ротовой жидкости больных раком молочной железы (Me(p0,25/p0,75))	84
Таблица 11. Значения лабораторных маркеров оксидативных повреждений белков и ДНК в сыворотке крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы (Me(p0,25/p0,75))	85
Рисунок 6. Железо-восстанавливающая активность плазмы крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы (Me(p0,25/p0,75))	88
Рисунок 7. Способность радикальной сорбции плазмы крови и ротовой жидкости больных раком молочной железы (Me(p0,25/p0,75))	89
Рисунок 8. Концентрация глутатиона в эритроцитарной взвеси и ротовой жидкости больных раком молочной железы (Me(p0,25/p0,75))	91
Рисунок 9. Уровень тиоловых групп в плазме крови больных раком молочной железы (Me(p0,25/p0,75))	92
Рисунок 10. Активность каталазы в эритроцитарной взвеси и ротовой жидкости больных раком молочной железы (Me(p0,25/p0,75))	93
Рисунок 11. Активность глутатионпероксидазы в эритроцитарной взвеси и ротовой жидкости больных раком молочной железы (Me(p0,25/p0,75))	94
Таблица 12. Регрессионные модели Кокса по данным однофакторного анализа для биохимических показателей крови	96
Таблица 13. Регрессионные модели Кокса по данным однофакторного анализа для маркеров окислительного стресса	97

Таблица 14. Регрессионные модели Кокса по данным многофакторного анализа	98
Формула 4. Уравнение для расчета прогноза выживаемости больных раком молочной железы в течение 2 лет	98
Рисунок 12. ROC-кривая расчетного коэффициента выживаемости больных раком молочной железы в течение 2 лет ($AUC = 0,852$)	99
Рисунок 13. Алгоритм скрининга, диагностики, прогнозирования и мониторинга рака молочной железы на основании оценки статуса рецепторов эстрогена и прогестерона, биохимических показателей крови и ротовой жидкости, данных анатомической и молекулярной визуализации, профиля онкомаркеров, статуса прооксидантно-антиоксидантной системы и наличия генетически ассоциированных признаков исследуемой онкопатологии	103

ПРИЛОЖЕНИЕ**АКТЫ ВНЕДРЕНИЯ****УТВЕРЖДАЮ**

Главный врач
ГБУЗ «Клинический онкологический
диспансер №1» министерства
здравоохранения Краснодарского края



Р.А. Мурашко

2026 г.

АКТ**об использовании предложения в лечебно-диагностическом процессе**

1. Наименование предложения: способ персонифицированного лабораторного мониторинга рака молочной железы.
2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: «Диагностические аспекты биохимических и молекулярно-генетических показателей крови и ротовой жидкости при раке молочной железы».
3. Исполнители: ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Шатохина Алина Станиславовна.
4. Научный руководитель: заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Быков Илья Михайлович.
5. Дата использования предложения: с января 2026 года.
6. Эффективность внедрения: Предложенный оригинальный способ обеспечил увеличение чувствительности и специфичности использования онкомаркеров рака молочной железы, что повысило эффективность раннего выявления данной онкопатологии, улучшило качество ведения больных с этим заболеванием, позволило мониторировать эффективность лечения и при необходимости вносить коррективы в лечебную тактику.

Заведующий клинико-диагностической
лабораторией

 Н.А. Цыган

Автор предложения

 А.С. Шатохина



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)**

350063, г. Краснодар, ул. им. Митрофана Седина, 4 тел. 8 (861) 268-36-84 факс 8 (861) 268-15-95 e-mail: corpus@ksma.ru
ИНН 2309023448 КПП 230801001

№ _____ от " _____ " _____ 20 ____ г. на № _____ от " _____ " _____ 20 ____ г.

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
работы ФГБОУ ВО КубГМУ

Минздрава России
д.м.н., профессор

Т.В. Гайворонская

20 26 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертации Шатохиной Алины Станиславовны
в учебный процесс кафедры фундаментальной и клинической биохимии
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Шатохиной Алины Станиславовны на тему «Диагностические аспекты биохимических и молекулярно-генетических показателей крови и ротовой жидкости при раке молочной железы» внедрены в учебный процесс кафедры фундаментальной и клинической биохимии при изучении дисциплин «биологическая химия» и «клиническая биохимия», читаемых студентам по специальностям 31.05.01 Лечебное дело, 31.05.02 Педиатрия, 31.05.03 Стоматология, 32.05.01 Медико-профилактическое дело, 33.05.01 Фармация.

В течение 2025/2026 учебного года прочитано 8 лекций, включающих аспекты диссертационного исследования А.С. Шатохиной.

Заведующий кафедрой
фундаментальной и клинической биохимии
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор

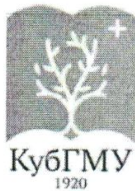
И.М. Быков

Автор предложения

А.С. Шатохина

Начальник учебного управления
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России

Е.И. Быстрова



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)

350063, г. Краснодар, ул. им. Митрофана Седина, 4 тел. 8 (861) 268-36-84 факс 8 (861) 268-15-95 e-mail: corpus@ksma.ru
ИНН 2309023448 КПП 230801001

№ _____ от " _____ " _____ 20 ____ г. на № _____ от " _____ " _____ 20 ____ г.

УТВЕРЖДАЮ

И.о. проректора по научно-исследовательской работе ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России

Д.м.н., профессор

« 31 »

С.Е. Гуменюк

20 26 г.

АКТ

об использовании предложения

1. Наименование предложения: система разработки и апробации новых онкомаркеров при раке молочной железы.
2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: кандидатская диссертация «Диагностические аспекты биохимических и молекулярно-генетических показателей крови и ротовой жидкости при раке молочной железы».
3. Исполнитель: ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Шатохина Алина Станиславовна.
4. Научный руководитель: заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Быков Илья Михайлович.
5. Место внедрения: Научно-технологический центр биомедицины.
6. Дата использования предложения: с января 2026 года.
7. Эффективность внедрения: предложенные рекомендации используются для разработки инновационных онкомаркеров при раке молочной железы и злокачественных новообразованиях другой локализации, оценки их чувствительности и специфичности, диагностической ценности.

Заведующий Научно-технологическим
центром биомедицины
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России,
Д.м.н., доцент

Автор предложения

К.А. Попов

А.С. Шатохина



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)

350063, г. Краснодар, ул. им. Митрофана Седина, 4 тел. 8 (861) 268-36-84 факс 8 (861) 268-15-95 e-mail: corpus@ksma.ru
ИНН 2309023448 КПП 230801001

№ _____ от " _____ " _____ 20 ____ г. на № _____ от " _____ " _____ 20 ____ г.

УТВЕРЖДАЮ

И.о. проректора по научно-исследовательской работе ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России,
д.м.н., профессор

« 28 »

С.Е. Гуменюк

20 26 г.

АКТ

об использовании предложения

1. Наименование предложения: система рекомендаций по разработке алгоритмов лабораторного прогнозирования исходов онкологических заболеваний.
2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: кандидатская диссертация «Диагностические аспекты биохимических и молекулярно-генетических показателей крови и ротовой жидкости при раке молочной железы».
3. Исполнитель: ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Шатохина Алина Станиславовна.
4. Научный руководитель: заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Быков Илья Михайлович.
5. Место внедрения: отдел фундаментальных исследований в области регенеративной медицины центральной научно-исследовательской лаборатории.
6. Дата использования предложения: с ноября 2025 года.
7. Эффективность внедрения: предложенные рекомендации позволили обосновать использование лабораторных показателей окислительного стресса в крови и ротовой жидкости в качестве прогностических биомаркеров, что обеспечило создание ряда математических моделей прогнозирования исходов экспериментальных патологических процессов.

И.о. заведующего Центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России,
к.б.н.

Автор предложения

Т.В. Русинова

А.С. Шатохина