**УДК 575.1/.2:599.89**

# ПРИМЕНЕНИЕ NGS И MLPA ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ ВАРИАНТОВ BRCA1/2 У АЗЕРБАЙДЖАНСКИХ ПАЦИЕНТОК С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**ЗУМРУД САФАРЗАДЕ**

*Институт генетических ресурсов Министерства науки и образования Азербайджанской Республики, Баку, AZ1106, пр. Азадлыг, 155*
*zum.mukh@gmail.com*

**Наследственные мутации в генах BRCA1 и BRCA2 являются одним из ключевых факторов развития рака молочной железы и яичников и ассоциированы с высоким пожизненным риском онкопатологии. Нарушение функции данных генов, участвующих в гомологичной рекомбинационной репарации двухцепочечных разрывов ДНК, приводит к геномной нестабильности и повышенной вероятности злокачественной трансформации клеток. Кроме того, выявление герминальных мутаций имеет важное клиническое значение, поскольку определяет чувствительность к таргетной терапии, включая ингибиторы PARP и препараты платины. Целью настоящего исследования являлся молекулярно-генетический анализ генов BRCA1 и BRCA2 у пациенток с раком молочной железы и оценка диагностической эффективности комбинированного применения методов секвенирования нового поколения (NGS) и MLPA. В исследование были включены 148 пациенток в возрасте от 22 до 90 лет (средний возраст манифестации — 58 лет), проходивших обследование и лечение в 2017–2023 гг. Всем пациенткам проведено первичное молекулярно-генетическое тестирование, а 17 пациенткам с трижды негативным фенотипом опухоли выполнен углублённый анализ методом NGS с последующим применением MLPA для исключения крупных геномных перестроек. Подготовка библиотек осуществлялась с использованием таргетной панели, секвенирование проводилось на платформе MiSeq со средним покрытием 100×. Интерпретация выявленных вариантов выполнялась в соответствии с рекомендациями ACMG с использованием международных баз данных и программ прогнозирования патогенности. В результате у 14 из 17 обследованных пациенток (82,4%) патогенные и вероятно патогенные варианты выявлены не были. У 3 пациенток (17,6%) обнаружены клинически значимые изменения, включая миссенс-вариант, нонсенс-мутации и фреймшифт-делецию в гетерозиготном состоянии, потенциально приводящие к преждевременной терминации трансляции и утрате функции белка. Крупные делеции и дупликации методом MLPA не выявлены. Полученные данные подтверждают высокую диагностическую ценность комплексного подхода NGS+MLPA и подчёркивают необходимость дальнейших исследований для уточнения частоты и спектра мутаций в азербайджанской популяции.**

***Ключевые слова:*** *BRCA1, BRCA2, рак молочной железы, секвенирование нового поколения, NGS, MLPA, герминальные мутации.*

## ВВЕДЕНИЕ

Унаследованные мутации в высокопенетрантных генах BRCA1 и BRCA2 вносят значимый вклад в развитие рака молочной железы и яичников и выявляются приблизительно у 5–10% пациентов с данной онкопатологией. (Foulkes, 2008). BRCA1 и BRCA2 — это гены, имеющие ключевое значение, главным образом участвующие в гомологичной рекомбинационной репарации двухцепочечных разрывов ДНК**.** Изменения в этих генах нарушают способность к репарации ДНК, что приводит к геномной предрасположенности и повышенной вероятности развития рака молочной железы и яичников. (Lucky et al., 2025) В недавнем проспективном когортном исследовании было


https://doi.org/10.61642/2026214
Available online 10 June 2026

установлено, что кумулятивный риск развития рака молочной железы к 80-летнему возрасту составляет 72% для носителей мутаций гена BRCA1 и 69% — для носителей мутаций гена BRCA2. (Kuchenbaecker et al., 2017). Наследственные и семейные случаи рака молочной железы сопряжены с более высоким пожизненным риском развития рака по сравнению со спорадическими случаями, однако именно эта группа получает наибольшую клиническую пользу от современных генетических знаний. Патогенные варианты в генах BRCA1 и BRCA2, которые чаще всего вовлечены в наследственный рак молочной железы и яичников, выявляются примерно у 15% женщин с семейным раком молочной железы. У носителей патогенного варианта BRCA1 пожизненный риск развития рака молочной железы составляет 59–87%, а для BRCA2 — 38–80% (Haliloglu et al., 2022). В настоящее время также становится очевидной роль низкопенетрантных и модифицирующих риск генетических полиморфизмов в более точной оценке индивидуального онкологического риска. (Couch et al., 2012; Ottini et al., 2013; Kuchenbaecker et al., 2014; Peterlongo et al., 2015). Почему так важно тестирование на варианты генов BRCA1/2? Индивиды, несущие герминальные патогенные варианты этих генов, чувствительны к ингибиторам пол **(**АДФ-рибозо**)** полимеразы **(**PARP**)** и к химиотерапии, вызывающей повреждение ДНК, включая препараты на основе платины. Поэтому их выявление важно, так как это влияет как на терапевтические, так и на профилактические стратегии. Эта информация используется для определения права на таргетную терапию, которая, как показано, обеспечивает значительные клинические преимущества для этой группы (Skoczylas, 2026). На протяжении более двух десятилетий прямое секвенирование по Сэнгеру оставалось основным методом клинической идентификации однонуклеотидных вариантов, а также вставок и делеций в генах BRCA1 и BRCA2. Выявление крупных геномных перестроек осуществлялось с использованием метода мультиплексной лигазозависимой амплификации зондов (MLPA). В настоящее время секвенирование по Сэнгеру в сочетании с MLPA по-прежнему рассматривается как «золотой стандарт» определения мутационного статуса BRCA1 и BRCA2. Вместе с тем значительный размер данных генов (5 592 и 10 257 пар оснований соответственно), высокая плотность гомополимерных участков, выраженная аллельная гетерогенность, а также отсутствие чётко определённых мутационных «горячих точек» существенно усложняют диагностический процесс, делая его времязатратным и экономически неэффективным. Развитие технологий секвенирования ДНК и внедрение настольных платформ секвенирования нового поколения (NGS) предложили высокопроизводительную альтернативу традиционным методам, обеспечив значительное повышение скорости, чувствительности и эффективности молекулярно-генетического тестирования (Feliubadaló et al., 2013; Yeo et al., 2014; Trujillano et al., 2015). Действительно, внедрение технологий секвенирования нового поколения (NGS) позволило существенно сократить сроки получения результатов при диагностике наследственной предрасположенности к раку молочной железы и яичников, что имеет принципиальное значение для своевременного клинического ведения носителей мутаций.

Внедрение таргетной терапии солидных опухолей с использованием ингибиторов поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) (O'Sullivan Coyne, Chen, Kummar, 2015; Colicchia et al., 2017; Stewart, Pilié, Yap, 2018) и, в частности, установление их эффективности в ряде клинических исследований III фазы, проведённых у женщин с патогенными вариантами генов BRCA1 или BRCA2, страдающих метастатическим раком яичников или распространённым раком молочной железы (Coleman et al., 2017; Robson et al., 2017; Oza et al., 2018; Litton et al., 2018), это подчёркивает статус мутаций BRCA1 и BRCA2 в качестве нового биомаркера и акцентирует важность сокращения времени выполнения анализа (turn-around time, TAT) для оперативного получения результатов и ускоренной идентификации носителей мутаций. В ответ на растущий спрос на генетическое

тестирование методы секвенирования нового поколения (NGS) постепенно внедряются в рутинную практику многих молекулярно-генетических лабораторий, включая нашу.

Технологии секвенирования нового поколения в настоящее время применяются на различных доступных платформах, включая Genome Sequencer (Roche-454 Life Sciences, Индианаполис, США), Genome Analyzer/HiSeq/MiSeq (Illumina-Solexa, Сан-Диего, США), секвенаторы Ion Torrent PGM и Ion Proton (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США), а также HeliScope (Helicos BioSciences, Кембридж, США) (Voelkerding, Dames & Durtschi, 2009; Rothberg et al., 2011; Wallace, 2016). Существуют ключевые различия в производительности, качестве данных и пропускной способности различных платформ: MiSeq демонстрировал наибольшую пропускную способность за один запуск (1,6 Гб/запуск, 60 Мб/ч) и наименьший уровень ошибок; 454 GS Junior генерировал самые длинные чтения (до 600 оснований), но обладал наименьшей пропускной способностью (70 Мб/запуск, 9 Мб/ч); в то время как Ion Torrent PGM обеспечивал наибольшую скорость обработки данных (80–100 Мб/ч) (Loman et al., 2012). Ion Torrent PGM является новой платформой секвенирования, которая принципиально отличается от других технологий секвенирования тем, что измеряет изменения pH, а не света, для фиксации событий полимеризации. Это первый инструмент «post-light» секвенирования, использующий эмульсионную ПЦР и подход секвенирования методом синтеза. Все четыре нуклеотида подаются пошагово в ходе автоматического запуска. При включении нуклеотидов, комплементарных шаблону, в вновь синтезируемую цепь гидролиз трифосфата нуклеотида сопровождается высвобождением одного протона на каждый присоединённый нуклеотид, что вызывает сдвиг pH окружающего раствора, регистрируемый модифицированным кремниевым чипом (Rothberg et al., 2011).

Целью настоящего исследования – является молекулярно-генетический анализ генов BRCA1 и BRCA2 у пациенток с раком молочной железы и оценка диагностической эффективности комбинированного применения NGS и MLPA.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа основана на анализе результатов молекулярно-генетического тестирования 148 больных РМЖ в возрасте от 22 до 90 лет (средний возраст манифестации заболевания составил 58 лет), которые в период с 2017 по 2023 г. проходили обследование и лечение в Онкологической Клинике Азербайджанского Медицинского Университета.

Исследование проводилось с соблюдением общепринятых принципов биоэтики; перед включением в исследование от всех участников было получено добровольное информированное согласие.

Критерием включения в исследование был диагноз РМЖ, не включения – отказ от молекулярно-генетического тестирования. Все вошедшие в исследование пациенты подписали информированное согласие на проведение молекулярно-генетического исследования и хранение биологического материала, а также заполнили специальную анкету, которая включала подробную информацию о наличии в семье родственников с онкологическими заболеваниями, в первую очередь РМЖ и рака яичников. На первом этапе всем пациентам было проведено молекулярно-генетическое исследование методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени для выявления распространенных в азербайджанской популяции мутаций в генах BRCA1 и BRCA2, ассоциированных с риском развития РМЖ. Пациентам группы трижды негативный фенотип опухоли (17 пациенток) было проведено молекулярно-генетическое исследование методом секвенирования «нового поколения» (англ. next generation sequencing – NGS) для выявления редких мутаций в генах BRCA1 и BRCA2, ассоциированных с риском развития РМЖ.

Метод секвенирования «нового поколения» (NGS). Для проведения молекулярно-генетического исследования методом NGS ДНК выделяли из 200 мкл крови на колонках с использованием наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit (“Qiagen”, Германия), позволяющих получать ДНК с концентрацией не менее 10 нг/мкл согласно протоколу производителя. Библиотеки были подготовлены с помощью панели TruSight Cancer (“Illumina”, США) и реагентов для подготовки библиотек TruSight Rapid Capture (“Illumina”, США) с использованием методики селективного захвата участков ДНК. Пробоподготовку выполняли по стандартному протоколу, предоставленному производителем. Секвенирование проводили на приборе MiSeq (“Illumina”, США) методом парно-концевого чтения (2×151 пар оснований) со средним покрытием 100× с использованием реагентов MiSeq Reagent Kits v2 (“Illumina”, США). Полученные после секвенирования данные были автоматически обработаны с помощью программного обеспечения, установленного на приборе, для фильтрации низкокачественных ридов, выравнивания относительно референсной последовательности генома человека (hg19), а также идентификации полученных генетических вариантов. Анализ полученных с прибора данных (в текстовом формате) проводился на персональном компьютере с использованием программного обеспечения Variant Studio 2.2 (“Illumina”, США), которое позволяет аннотировать и классифицировать выявленные генетические нарушения. Для интерпретации выявленных генетических вариантов использовались базы данных dbSNP (The Single Nucleotide Polymorphism database), ClinVar (Clinical Variation), HGMD (Human Gene Mutation Database), BIC (Breast Cancer Information Core), OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). Частоту аллелей оценивали с помощью баз данных проектов ExAC (Exome Aggregation Consortium) и 1000G (1000 Genomes Project), а функциональную значимость найденных генетических вариантов – с использованием программ предсказания патогенности CADD (Combined Annotation Dependent Depletion), PolyPhen (Polymorphism Phenotyping) и Sift (Sorting Intolerant from Tolerant). Полученные варианты интерпретировали согласно классификации, предложенной Американским колледжем медицинской генетики (American College of Medical Genetics and Genomics – ACMG). Варианты классифицировались как патогенные и вероятно патогенные, а также как варианты с неизвестным клиническим значением с учетом информации в доступных базах данных (упомянуты выше) и критериев для оценки генетических вариантов, предложенных ACMG. Варианты, не имеющие клинического значения, в данной работе не рассматривались. Для реакции Сэнгера применяли реактивы BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США). Секвенирование проводили на приборе ABI PRISM 3100 (“Applied Biosystems”, США). Все этапы исследования выполняли согласно инструкциям, предоставленным фирмами-производителями.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках настоящего исследования из 148 обследованных пациенток 17 соответствовали критериям углублённого молекулярно-генетического анализа и были направлены на проведение NGS (с последующим MLPA при необходимости). Применение данных методов позволило оценить наличие точечных нуклеотидных замен, малых инсерций/делеций, а также крупных перестроек генов, ассоциированных с наследственными онкологическими синдромами.

**Таблица 1.**

Результаты выявления мутаций методом NGS и MLPA.

| № | Метод анализа | Мутация | Генотип |
|---|---|---|---|
| 1 | NGS | Патогенные и вероятно патогенные варианты, имеющие клиническое значение, не выявлены | - |
| 2 | NGS | Патогенные и вероятно патогенные варианты, имеющие клиническое значение, не выявлены | - |
| 3 | NGS | c.2504A>C p.Tyr835Ser RCV004606829 | гетерозиготный |
| 4 | NGS+MLPA | Патогенные и вероятно патогенные варианты, имеющие клиническое значение, не выявлены | - |
| 5 | NGS | Патогенные и вероятно патогенные варианты, имеющие клиническое значение, не выявлены | - |
| 6 | NGS+MLPA | Патогенные и вероятно патогенные варианты, имеющие клиническое значение, не выявлены | - |
| 7 | NGS | Патогенные и вероятно патогенные варианты, имеющие клиническое значение, не выявлены | - |
| 8 | NGS | Патогенные и вероятно патогенные варианты, имеющие клиническое значение, не выявлены | - |
| 9 | NGS+MLPA | Патогенные и вероятно патогенные варианты, имеющие клиническое значение, не выявлены | - |
| 10 | NGS | Патогенные и вероятно патогенные варианты, имеющие клиническое значение, не выявлены | - |
| 11 | NGS+MLPA | Патогенные и вероятно патогенные варианты, имеющие клиническое значение, не выявлены | - |
| 12 | NGS+MLPA | Патогенные и вероятно патогенные варианты, имеющие клиническое значение, не выявлены | - |
| 13 | NGS | NM_000059.4 c.3455T>G p.(Leu1152Ter) | - |
| 14 | NGS+MLPA | Патогенные и вероятно патогенные варианты, имеющие клиническое значение, не выявлены | - |
| 15 | NGS+MLPA | NM_000059.4 c.6270_6271del p.(His2090GlnfsTer9) | гетерозиготный |
| 16 | NGS+MLPA | NM_007294.4 c.5444G>A p.(Trp1815Ter) | гетерозиготный |
| 17 | NGS+MLPA | Патогенные и вероятно патогенные варианты, имеющие клиническое значение, не выявлены | - |

По результатам проведённого анализа у большинства обследованных лиц (14 из 17; 82,4%) патогенные и вероятно патогенные варианты, имеющие клиническое значение, выявлены не были. Указанные образцы характеризовались отсутствием клинически значимых мутаций как при использовании только NGS, так и при комбинированном анализе NGS+MLPA, что свидетельствует об отсутствии выявляемых генетических изменений в пределах чувствительности применённых методик.

В то же время у 3 пациенток (17,6%) были выявлены генетические варианты, потенциально имеющие клиническое значение.

У одной обследуемой (образец №3) при анализе методом NGS был выявлен вариант c.2504A>C (p.Tyr835Ser; RCV004606829) в гетерозиготном состоянии. Данный вариант представляет собой миссенс-мутацию, приводящую к замене тирозина на серин в соответствующей позиции белка. Учитывая его локализацию в кодирующей области гена и зарегистрированный идентификатор в базе ClinVar, данный вариант требует дополнительной интерпретации с учётом клинических данных пациента, семейного анамнеза и возможных функциональных последствий.

В образце №13 методом NGS был выявлен вариант NM_000059.4 c.3455T>G p.(Leu1152Ter) с аллельной частотой около 51%. Указанная нуклеотидная замена приводит к формированию стоп-кодона и преждевременному обрыву трансляции белка, что потенциально может обусловливать утрату его функции. Выявленная аллельная частота соответствует гетерозиготному состоянию, что характерно для герминальных мутаций. Наличие нонсенс-мутации указывает на высокую вероятность патогенного эффекта, однако окончательная клиническая интерпретация должна основываться на рекомендациях ACMG и корреляции с фенотипическими данными.

В образце №15 при использовании комбинированного подхода NGS+MLPA была выявлена делеция NM_000059.4 c.6270_6271del p.(His2090GlnfsTer9) в гетерозиготном состоянии. Данная мутация приводит к сдвигу рамки считывания и формированию преждевременного стоп-кодона, что, как правило, ассоциируется с выраженным нарушением структуры и функции белка. Фреймшифт-мутации данного типа относятся к категории вариантов с высокой вероятностью патогенности.

Кроме того, у пациентки №16 методом NGS+MLPA был идентифицирован вариант NM_007294.4 c.5444G>A p.(Trp1815Ter) в гетерозиготном состоянии. Данная нонсенс-мутация приводит к замене триптофана стоп-кодоном, что вызывает укорочение белкового продукта и потенциальную потерю его функциональной активности. Наличие данной мутации в кодирующей области гена позволяет рассматривать её как клинически значимую и требующую дальнейшей клинико-генетической оценки.

Следует отметить, что применение метода MLPA в сочетании с NGS у части пациентов не выявило крупных делеций или дупликаций исследуемых генов, что указывает на отсутствие значимых структурных перестроек в анализируемых участках генома. Это подчёркивает диагностическую ценность комбинированного подхода, позволяющего одновременно выявлять как точечные мутации, так и копийные вариации.

Таким образом, результаты исследования демонстрируют, что в обследованной выборке преобладали случаи без выявленных клинически значимых генетических вариантов, однако у ограниченного числа пациентов были обнаружены нонсенс- и фреймшифт-мутации, потенциально ассоциированные с нарушением функции соответствующих генов. Выявленные генетические изменения требуют дальнейшего анализа в контексте клинических проявлений заболевания, семейного анамнеза и рекомендаций по медико-генетическому консультированию.

**ВЫВОДЫ**

В результате проведённого молекулярно-генетического исследования с использованием методов NGS и комбинированного подхода NGS+MLPA установлено, что в большинстве случаев (82,4%) клинически значимые патогенные и вероятно патогенные варианты выявлены не были. Это свидетельствует о том, что у основной части обследованной группы отсутствуют обнаруживаемые в рамках применённой панели герминальные мутации исследуемых генов.

Вместе с тем у 17,6% пациентов были идентифицированы генетические изменения, включая миссенс-вариант, нонсенс-мутации и фреймшифт-делецию в гетерозиготном состоянии. Выявленные нонсенс- и фреймшифт-варианты потенциально приводят к преждевременной терминации трансляции и утрате функциональной активности белка, что позволяет рассматривать их как клинически значимые и ассоциированные с повышенным генетическим риском. Обнаруженные изменения требуют обязательной клинико-генетической интерпретации, оценки семейного анамнеза и проведения медико-генетического консультирования.

Полученные данные подтверждают диагностическую информативность комплексного применения NGS и MLPA для выявления как точечных мутаций, так и структурных перестроек генов, а также подчёркивают необходимость дальнейшего расширения выборки для более точной оценки частоты и спектра мутаций в исследуемой популяции.

**ЛИТЕРАТУРА**

**Coleman R.L., Oza A.M., Lorusso D., Aghajanian C. et al.** on behalf of the ARIEL3 investigators. Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet 2017;390(10106):1949–1961 DOI 10.1016/S0140-6736(17)32440-6.

**Couch F.J., Gaudet M.M., Antoniou A.C., Ramus S.J. et al.** Common variants at the 19p13.1 and ZNF365 loci are associated with ER subtypes of breast cancer and ovarian cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention 2012;21(4):645–657 DOI 10.1158/1055-9965.EPI-11-0888.

**Colicchia V., Petroni M., Guarguaglini G., Sardina F. et al.** PARP inhibitors enhance replication stress and cause mitotic catastrophe in MYCN-dependent neuroblastoma. Oncogene 2017;36(33):4682–4691 DOI 10.1038/onc.2017.40.

**Haliloglu G., Gozukara Bag.H., Eser S., Ozdemir S., Ozgur G., Altundag K.** Evaluation of hereditary/familial breast cancer patients with multigene targeted next generation sequencing panel and MLPA analysis in Turkey. Cancer Genetics, 2022;269–270, 12–22**.** https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2022.02.006

**Feliubadaló L., Lopez-Doriga A., Castellsagué E., del Valle J. et al.** Next-generation sequencing meets genetic diagnostics: development of a comprehensive workflow for the analysis of BRCA1 and BRCA2 genes. European Journal of Human Genetics 2013;21(8):864–870 DOI 10.1038/ejhg.2012.270.

**Foulkes W.D.** Inherited susceptibility to common cancers. *The New England Journal of Medicine* 2008;359(20):2143–2153 DOI 10.1056/NEJMra0802968.

**Kuchenbaecker K.B., Hopper J.L., Barnes D.R., Phillips K.A. et al.** Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. JAMA 2017;317(23):2402–2416 DOI 10.1001/jama.2017.7112.

**Kuchenbaecker K.B., Neuhausen S.L., Robson M., Barrowdale D. et al.** Associations of common breast cancer susceptibility alleles with risk of breast cancer subtypes in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. Breast Cancer Research 2014;16(6):3416 DOI 10.1186/s13058-014-0492-9.

**Litton J.K., Rugo H.S., Ettl J., Hurvitz S.A., Gonçalves A., Lee K-H. et al.** Talazoparib in patients with advanced breast cancer and agermline BRCA mutation. New England Journal of Medicine 2018;379(8):753–763 DOI 10.1056/NEJMoa1802905.

**Loman N.J., Misra R.V., Dallman T.J., Constantinidou C., Gharbia S.E., Wain J., Pallen M.J.** Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. Nature Biotechnology 2012;30(5):434–439 DOI 10.1038/nbt.2198.

**Lucky M.H., Baig S., Hanif M., Asghar A.H.** Systematic review: Comprehensive methods for detecting BRCA1 and BRCA2 mutations in breast and ovarian cancer. Asian Pacific Journal of Cancer Biology, 2025; 10(1), 229–238. https://doi.org/10.31557/APJCB.2025.10.1.229

**Ottini L., Silvestri V., Saieva C., Rizzolo P., Zanna I. et al.** Association of low-penetrance alleles with male breast cancer risk and clinicopathological characteristics: results from a multicenter study in Italy. Breast Cancer Research and Treatment 2013;138(3):861–868 DOI 10.1007/s10549-013-2459-4.

**Oza A.M., Matulonis U.A., Malander S. Hudgens S., Sehouli J., del Campo J.M. et al.** Quality of life in patients with recurrent ovarian cancer treated with niraparib versus placebo (ENGOT-OV16/NOVA): results from a double-blind, phase 3, randomised controlled trial. Lancet Oncology 2018;19(8):1117–1125 DOI 10.1016/S1470-2045(18)30333-4.

**O'Sullivan Coyne G., Chen A., Kummar S.** Delivering on the promise: poly ADP ribose polymerase inhibition as targeted anticancer therapy. Current Opinion in Oncology 2015;27(6):475–481 DOI 10.1097/CCO.0000000000000238.

**Peterlongo P., Chang-Claude J., Moysich K.B., Rudolph A., Schmutzler R.K. et al.** Candidate genetic modifiers for breast and ovarian cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention 2015;24(1):308–316 DOI 10.1158/1055-9965.EPI-14-0532.

**Robson M., Im S-A., Senkus E., Xu B., Domchek S.M., Masuda N., Delaloge S., Li W., Tung N., Armstrong A., Wu W., Goessl C., Runswick S., Conte P.** Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation. New England Journal of Medicine 2017;377(6):523–533 DOI 10.1056/NEJMoa1706450.

**Rothberg J.M., Hinz W., Rearick T.M., Schultz J., Mileski W., Davey M. et al.** An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature 2011;475(7356):348–352 DOI 10.1038/nature10242.

**Skoczylas S., Płoszaj T., Dróżdż I., Moczulska H., Serafin M., Piekarska K., Wojtyczka O., Żeżawska K., Zmysłowska A.** Germline BRCA1/2 Variants in Polish Patients with Family History of Breast and Ovarian Cancer: Prevalence, CNV Detection, and Identification of a Novel Loss-of-Function Mutation. Current Oncology, 2026;33(1):10. https://doi.org/10.3390/curroncol33010010

**Stewart R.A., Pilié P.G., Yap T.A.** Development of PARP and immune-checkpoint inhibitor combinations. Cancer Research 2018;78(24):6717–6725 DOI 10.1158/0008-5472.CAN-18-2652.

**Voelkerding K.V., Dames S.A., Durtschi J.D.** Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. Clinical Chemistry 2009;55(4):641–658 DOI 10.1373/clinchem.2008.112789.

**Wallace A.J.** New challenges for BRCA testing: a view from the diagnostic laboratory. European Journal of Human Genetics 2016;24(S1):S10–S18 DOI 10.1038/ejhg.2016.94.

## NGS VƏ MLPA METODLARININ AZƏRBAYCANLI SÜD VƏZI XƏRÇƏNGI OLAN PASIYENTLƏRDƏ BRCA1/2 GENLƏRINDƏ PATOGEN VARIANTLARIN AŞKARLANMASINDA TƏTBIQI

**Zümrüd Səfərzadə**

*Azərbaycan Respublikası Elm və Təhsil Nazirliyi Genetik Ehtiyatlar İnstitutu*

BRCA1 və BRCA2 genlərində irsi mutasiyalar süd vəzi və yumurtalıq xərçənginin inkişafının əsas amillərindən biri olub, ömürboyu yüksək onkoloji risklə assosiasiya olunur. İki zəncirli DNT qırılmalarının homoloji rekombinasiya yolu ilə reparasiyasında iştirak edən bu genlərin funksiyasının

pozulması genomik qeyri-sabitliyə və hüceyrələrin bədxassəli transformasiya ehtimalının artmasına səbəb olur. Bundan əlavə, germinal mutasiyaların aşkar edilməsi mühüm klinik əhəmiyyət daşıyır, çünki bu, hədəfli terapiyaya, o cümlədən PARP inhibitorlarına və platin tərkibli preparatlara həssaslığın müəyyən edilməsinə imkan verir. Tədqiqatın məqsədi süd vəzi xərçəngi olan pasiyentlərdə BRCA1 və BRCA2 genlərinin molekulyar-genetik analizinin aparılması və yeni nəsil sekvensləmə (NGS) və MLPA metodlarının kombinə olunmuş tətbiqinin diaqnostik effektivliyinin qiymətləndirilməsi olmuşdur.

Tədqiqata 2017–2023-cü illərdə müayinə və müalicə almış, yaşı 22-dən 90-a qədər olan (xəstəliyin orta manifestasiya yaşı — 58 il) 148 pasiyent daxil edilmişdir. Bütün pasiyentlərdə ilkin molekulyar-genetik test aparılmış, şişin üçqat neqativ fenotipinə malik 17 pasiyentdə isə NGS metodu ilə dərinləşdirilmiş analiz icra olunmuş və iri genom yenidənqurmalarını istisna etmək məqsədilə sonradan MLPA tətbiq edilmişdir. Kitabxanaların hazırlanması hədəfli paneldən istifadə olunmaqla aparılmış, sekvensləmə MiSeq platformasında orta hesabla 100× örtük dərinliyi ilə həyata keçirilmişdir. Aşkarlanmış variantların interpretasiyası beynəlxalq məlumat bazaları və patogenlik proqnozlaşdırma proqramlarından istifadə edilməklə ACMG tövsiyələrinə uyğun şəkildə aparılmışdır.

Nəticədə, müayinə olunan 17 pasiyentdən 14-də (82,4%) patogen və ehtimal olunan patogen variantlar aşkar edilməmişdir. 3 pasiyentdə (17,6%) klinik əhəmiyyətli dəyişikliklər müəyyən edilmişdir; bunlara heteroziqot vəziyyətdə olan missens-variant, nonsens-mutasiya və freymşift delesiyası daxildir ki, bunlar translasiya prosesinin vaxtından əvvəl dayanmasına və zülal funksiyasının itirilməsinə səbəb ola bilər. MLPA metodu ilə iri delesiyalar və duplikasiyalar aşkar edilməmişdir. Əldə olunan nəticələr NGS və MLPA metodlarının kompleks tətbiqinin yüksək diaqnostik dəyərini təsdiqləyir və Azərbaycan populyasiyasında mutasiyaların tezliyi və spektrinin daha dəqiq müəyyənləşdirilməsi üçün əlavə tədqiqatların aparılmasının vacibliyini vurğulayır.

***Açar sözlər:*** *BRCA1, BRCA2, süd vəzi xərçəngi, yeni nəsil sekvenləşdirmə, NGS, MLPA, germinal mutasiyalar*

## APPLICATION OF NGS AND MLPA METHODS FOR THE DETECTION OF PATHOGENIC VARIANTS IN THE BRCA1/2 GENES IN AZERBAIJANI PATIENTS WITH BREAST CANCER

**Zumrud Safarzade**

*Genetic Resources Institute, Ministry of Science and Education of the Republic of Azerbaijan*

Hereditary mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes are among the key factors in the development of breast and ovarian cancer and are associated with a high lifetime risk of oncological disease. Impairment of these genes, which are involved in homologous recombination repair of DNA double-strand breaks, leads to genomic instability and an increased likelihood of malignant cell transformation. Furthermore, the identification of germline mutations has important clinical significance, as it determines sensitivity to targeted therapies, including PARP inhibitors and platinum-based agents. The aim of the present study was to perform a molecular genetic analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in patients with breast cancer and to evaluate the diagnostic effectiveness of the combined use of next-generation sequencing (NGS) and MLPA methods.

The study included 148 patients aged 22 to 90 years (mean age at manifestation — 58 years) who underwent examination and treatment between 2017 and 2023. All patients received primary molecular genetic testing, and 17 patients with a triple-negative tumor phenotype underwent extended analysis using NGS, followed by MLPA to exclude large genomic rearrangements. Library preparation was performed using a targeted panel, and sequencing was carried out on the MiSeq platform with an average coverage depth of 100×. The interpretation of identified variants was conducted in accordance with ACMG guidelines, using international databases and pathogenicity prediction tools.

As a result, no pathogenic or likely pathogenic variants were detected in 14 of the 17 examined patients (82.4%). Clinically significant alterations were identified in 3 patients (17.6%), including a missense variant, nonsense mutations, and a heterozygous frameshift deletion, potentially leading to

premature termination of translation and loss of protein function. No large deletions or duplications were detected by MLPA. The obtained data confirm the high diagnostic value of the combined NGS+MLPA approach and highlight the need for further studies to clarify the frequency and mutation spectrum in the Azerbaijani population.

***Keywords:*** *BRCA1, BRCA2, breast cancer, next-generation sequencing, NGS, MLPA, germline mutations.*

***Çapa təqdim etmişdir: Bayram Bayramov, t.ü.f.d.***
***Redaksiyaya daxil olma tarixi: 27.02.2026***
***Təkrar işlənməyə göndərilmə tarixi: 25.03.2026***
***Çapa qəbul edilmə tarixi: 27.04.2026***