

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ»

УДК [616-071:577.213.32]:[618.19+618.11]-006.6

КУРСТАК
Ирина Андреевна

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РИСКА РАЗВИТИЯ И ОСОБЕННОСТЕЙ
ТЕЧЕНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ОСНОВАНИИ
РАЗРАБОТАННОГО СКРИНИНГОВОГО МЕТОДА ВЫЯВЛЕНИЯ
МУТАЦИЙ В ГЕНАХ BRCA И ПОКАЗАТЕЛЕЙ
ИНТРАТУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

по специальности 14.03.10 – клиническая
лабораторная диагностика

Минск, 2016

Научная работа выполнена в учреждении образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Научный руководитель: **Ляликов Сергей Александрович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики и иммунологии УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Официальные оппоненты: **Костюк Светлана Андреевна**, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры эпидемиологии и микробиологии государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Прохорова Виолетта Игоревна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая диагностическим отделом с группой лучевой диагностики государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

Оппонирующая организация: Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Защита состоится 25 февраля 2016 года в 14-00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.15.02 при ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» по адресу: 220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3, корпус 3. Телефон ученого секретаря (8-017) 340-00-91, e-mail: natalkam@it.org.by.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования».

Автореферат разослан « 20 » января 2016 года

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций,
кандидат медицинских наук, доцент



Н.В. Мурашко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами

Диссертационная работа выполнена в рамках межкафедральных инициативных тем НИР: «Патогенез, клиника, лечение и профилактика экзозависимой патологии в современных условиях» (государственный регистрационный номер 2006610; 01.2006–12.2010 гг.), «Оценка диагностической и прогностической значимости факторов иммунного ответа при дисгормональных состояниях, воспалительных и опухолевых процессах» (государственный регистрационный номер 20111127; 01.2011–12.2015 гг.) и программы трансграничного сотрудничества ЕИДП Латвия–Литва–Беларусь «Development of modern breast cancer awareness, prevention, early detection and management measures in border regions of Latvia, Lithuania and Belarus» (номер регистрации LLB–1–090; 01.2007–12.2013 гг.). Тема диссертации соответствует Государственной комплексной программе профилактики, диагностики и лечения онкологических заболеваний на 2011–2014 годы.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – разработать на основе предложенных новых праймеров скрининговую методику выявления мутаций в генах BRCA и определить значимость молекулярно-генетических нарушений и особенностей интратуморального иммунного ответа для оценки риска возникновения и прогноза развития рака молочной железы.

Задачи исследования:

1. Разработать методику скрининговых исследований на наличие мутаций в гене BRCA на основе предложенных новых праймеров и протокола выполнения полимеразной цепной реакции; оценить диагностическую эффективность ее применения.
2. Определить частоту встречаемости и спектр мутаций генов BRCA у пациенток, страдающих РМЖ и РЯ, а также у здоровых жителей западного региона Беларуси.
3. Установить критерии целенаправленного отбора здоровых лиц и пациенток с диагнозом РМЖ и/или РЯ для последующего молекулярно-генетического исследования на наличие мутаций в генах BRCA.
4. Оценить значимость показателей интратуморального иммунного ответа, клеточного цикла и рецепторного статуса в опухолевой ткани при раке молочной железы для прогноза течения заболевания при наличии мутации в генах BRCA.

Научная новизна

Научная новизна диссертационного исследования состоит в получении новых данных о риске возникновения наследственного рака молочной железы у жителей Республики Беларусь по результатам скрининговых исследований с

применением методики, разработанной с использованием праймеров с предложенной последовательностью олигонуклеотидов, а также в оценке значимости показателей иммунного ответа, клеточного цикла и рецепторного статуса опухоли для прогноза трехлетней выживаемости, возврата болезни и наличия мутации в генах BRCA у пациенток с диагнозом рак молочной железы.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанная методика полимеразной цепной реакции с электрофоретической схемой детекции состоит в использовании самостоятельно подобранной последовательности нуклеотидов праймеров и реагентов отечественного производителя «Праймтех», что позволяет определить мутацию 5382insC в онкогене BRCA1 с диагностической эффективностью 100,0% (за стандарт приняты результаты, полученные при использовании набора НТФ «Литех»).

2. Частота встречаемости мутаций в генах BRCA у пациенток без учета наследственной отягощенности с диагнозом РМЖ составляет 3,8%, характерной является мутация 5382insC в гене BRCA1 (64,7%, $p > 0,05$); у пациенток с диагнозом РЯ – 6,8%, при этом распределение мутаций статистически значимо не различается ($p > 0,05$); у здоровых лиц без наследственной отягощенности – 2,4%; у здоровых лиц при наличии РМЖ и/или РЯ в роду – 15,3%.

3. Показаниями для направления на молекулярно-генетический анализ пациенток с диагнозом РМЖ является наличие у родственников I–II степени РМЖ еще у одной женщины (АР – 63,6%) и первично-множественная опухоль у пациентки (АР – 69,7%); пациенток с диагнозом РЯ – наличие еще одной женщины, страдающей РЯ (АР – 69,8%), и три и более случая онкопатологии в семье, исключая РЯ (АР – 74,9%); показаниями для направления на исследование здоровых лиц является наличие в роду даже одного родственника I–II степени родства с диагнозом РМЖ или РЯ (АР – 79,3% и 77,5%, соответственно) и возраст на момент первичной диагностики РМЖ и/или РЯ у члена семьи младше 44 лет.

4. Надежной характеристикой для прогноза наличия мутаций в генах BRCA является интенсивность инфильтрации опухоли лимфоцитами с фенотипом CD3+ и CD8+ (чувствительность – 83,3%, специфичность – 95,8%). На прогноз трехлетней выживаемости пациенток с диагнозом РМЖ достоверно влияют наличие мутации в генах BRCA, размер опухоли, а также показатели местного иммунного ответа в ткани опухоли: экспрессия клеток с фенотипами CD3+, CD8+, CD45RO+, интенсивность экспрессии HLA-DR и лимфоидная инфильтрация ($p < 0,001$); на прогноз развития возврата болезни при РМЖ оказывают влияние такие показатели, как экспрессия клеток с фенотипами CD8+, CD45RO+, HLA-DR, лимфоидная инфильтрация, а также возраст на

момент диагностики заболевания, размер опухоли, степень поражения регионарных лимфатических узлов и наличие мутации в генах BRCA ($p=0,035$).

Личный вклад соискателя

Работа выполнена на базе кафедры клинической лабораторной диагностики и иммунологии УО «Гродненский государственный медицинский университет» и УЗ «Гродненская областная клиническая больница». Соискателем самостоятельно проведен патентно-информационный поиск по теме диссертационного исследования [5]. Лично автором проводилось анкетирование респондентов и выполнялась выкопировка данных из медицинской документации (вклад соискателя – 100%) [3, 4, 13, 14, 17]. Автор совместно с научным руководителем разрабатывала дизайн праймеров для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) (вклад соискателя – 50%), обработку методик ПЦР определения мутаций в генах BRCA на базе клинко-диагностической лаборатории Гродненской областной клинической больницы (вклад соискателя – 95%) [8, 11, 12, 16, 22, 26]. Статистическая обработка данных и теоретическое обобщение результатов проведено совместно с научным руководителем (вклад соискателя – 80%) [1, 2, 6, 9, 10, 23, 24, 25, 27]. Иммуногистохимическое исследование образцов РМЖ и РЯ выполнялось в УЗ «Гродненское областное патологоанатомическое бюро» (вклад соискателя – 20%) [7, 15, 18, 19, 20, 21].

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Результаты исследования и основные положения диссертации были доложены на следующих научных форумах:

- Республиканская научно-практическая конференция «Современные молекулярно-генетические методы диагностики в медицине» (Гомель, 2010).
- Республиканская научно-практическая молодежная конференция с международным участием «Научные стремления-2010» (Минск, 2010).
- Республиканская научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные проблемы патологической анатомии» (Гродно, 2010).
- Конференции студентов и молодых ученых (Гродно, 2011, 2013, 2014, 2015).
- Международная конференция молодых ученых «Молодежь в науке-2011» (Минск, 2011).
- Научно-практическая конференция, посвященная 55-летию учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет» (Гродно, 2013).
- Итоговая научно-практическая конференция «Актуальные проблемы медицины» (Гродно, 2014).

По теме диссертации разработана инструкция по применению [26]. Результаты исследования внедрены в работу лечебно-профилактических учреждений (3 акта внедрения) и в учебный процесс (2 акта внедрения). Получена приоритетная справка от 30.12.2013 № А20131623 о принятии заявки на патент «Способ прогнозирования мутации в генах BRCA у пациенток с раком молочной железы» [27].

Опубликованность результатов диссертации

По результатам диссертационного исследования опубликованы 25 печатных работ общим объемом 6,9 авторских листа: публикаций по теме диссертации, соответствующих пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь – 9; количество других публикаций (материалы или тезисы докладов научных съездов, конференций, симпозиумов и др.) – 16. Из них в соавторстве опубликовано 20 работ, без соавторов – 5.

Министерством здравоохранения утверждена 1 инструкция по применению, получена 1 приоритетная справка на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа написана на русском языке, изложена на 141 странице машинописного текста (106 страниц основного текста) и состоит из введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех глав изложения результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и приложений. Диссертация содержит 41 таблицу, 25 рисунков и 8 приложений, таблицы и рисунки занимают 16 страниц. «Список использованных источников» включает 191 источник (53 – русскоязычных авторов и 138 – иностранных), «Список публикаций соискателя» содержит 27 работ.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материал и методы исследования

Проанкетированы с последующей оценкой клинического риска развития наследственного РМЖ и/или РЯ 16911 респондентов: 2190 пациенток с подтвержденным диагнозом РМЖ и/или РЯ, 14597 лиц, не имеющих онкологических заболеваний женской репродуктивной системы, и 124 человека без онкопатологии – родственники I–II степени родства пациенток с диагнозом РМЖ и/или РЯ. Критерии распределения в группы риска развития онкопатологии строились согласно рекомендациям инструкции по применению «Принципы организации и методы выявления лиц, имеющих наследственную предрасположенность к злокачественным новообразованиям», разработанной Залуцким И. В. и соавт. в 2007 году. В группу «высокого клинического риска

возникновения наследственного РМЖ и/или РЯ» (группа ВР) вошли лица, у которых в роду было три и более родственников I–II степени родства с диагнозом РМЖ и/или РЯ (или 2 родственника, если обследуемый сам болен РМЖ и/или РЯ). В группу лиц с «подозрением на наличие риска возникновения наследственного РМЖ и/или РЯ» (группа ПР) включались лица, у которых РМЖ или РЯ развился в возрасте младше 40 лет; а также имеющие двух родственников I–II степени родства с диагнозом РМЖ и/или РЯ (или 1 родственник, если обследуемый сам болен РМЖ и/или РЯ); а также был в семейном анамнезе РМЖ и РЯ у одного больного. Группу ОтР (отсутствие клинического риска развития наследственного РМЖ и/или РЯ) составили лица, семейный анамнез которых не соответствовал ни одному из приведенных выше требований. Для анализа и сохранения данных, полученных в ходе опроса, и лабораторно-генетического обследования нами была создана компьютерная диагностическая информационно-аналитическая система (ДИАС) [13].

Молекулярно-генетическое исследование венозной крови на наличие мутаций в генах BRCA было выполнено 998 человекам: 449 пациенток с диагнозом РМЖ (1-я группа), 132 пациентки с РЯ (2-я группа), 124 здоровых человека с наличием среди родственников I–II степени родства РМЖ и/или РЯ (3-я группа) и 293 человека без онкопатологии, не имеющие близких родственников с диагнозом РМЖ и/или РЯ (4-я группа). Все пациентки из 1-й и 2-й групп проходили обследование и лечение в отделениях онкологического профиля УЗ «Гродненская областная клиническая больница» с 1987 по 2013 год. Диагноз онкозаболевания у каждой пациентки подтвержден морфологически. Возраст пациенток, страдающих РМЖ, от 27,6 до 85,5 лет. По Международной классификации TNM, T0 стадия опухоли была у 0,7%, T1 – у 42,8%, T2 – у 45,4%, T3 – у 5,3%, T4 – у 5,8% пациенток. Первично-множественные неоплазии наблюдались у 70 из 449 обследованных (15,6%). В 79,1% случаев РМЖ страдала только пациентка, в 15,8% семей было два случая РМЖ, в 3,8% – три, в 1,0% – четыре и в 0,3% – пять случаев РМЖ в роду.

Возраст пациенток с диагнозом РЯ был от 21,3 до 81,2 года. T1 стадия РЯ по классификации FIGO была установлена у 17,1% женщин, T2 – у 11,6%, T3 – у 61,2%, T4 – у 10,1%. Первично-множественный РЯ наблюдался у 9 из 127 женщин (7,1%). В 89,8% случаев РЯ страдала только пациентка, в 8,5% – кроме обследуемой еще у одной женщины в семье был РЯ, в 0,8% – РЯ в роду встречался трижды и в 0,8% – четыре раза.

Возраст здоровых лиц в 3-й группе от 18,4 до 74,1 лет. У 83,9% человек среди родственников I–II степени родства был РМЖ: в 58,7% случаев у одной родственницы, в 29,8% – у двух, в 9,6% – у трех, в 1,9% – у четырех; у 35,5% был РЯ: один случай РЯ в роду встречался в 79,5% случаев, два – в 11,5% и в 9,0% три и более случаев РЯ.

4-я группа состояла из 293 волонтеров без онкопатологии и РМЖ и/или РЯ среди родственников I–II степени родства. Здоровые лица были в возрасте от 18,3 до 74,7 лет. Из 293 здоровых лиц среди родственников I–II степени родства не было случаев онкопатологии у 81 человека (27,7%), один случай онкопатологии – у 72 человек (24,5%), два – у 65 (22,2%), три – у 47 (16,0%), четыре – у 19 (6,5%), пять и более – у 9 человек (3,1%).

Молекулярно-генетическое исследование 998 образцов ДНК на наличие мутаций в генах BRCA проводилось методом ПЦР. Геномную ДНК из лейкоцитов венозной крови пациенток с диагнозом РМЖ и/или РЯ и здоровых лиц выделяли с помощью набора «ДНК-сорб-В» («Амплиценс», Россия). Амплификация выделенной ДНК была выполнена по заданному протоколу в автоматическом режиме на амплификаторе-термоциклере «Терцик» («ДНК-технология», Россия). ПЦР производилась праймерами, подобранными нами самостоятельно с использованием Интернет-ресурса GenBank sequence database (таблица 1). Синтезом праймеров для пяти мутаций в генах BRCA по разработанной последовательности нуклеотидов занималась ОДО «Праймтех» (Беларусь). Способом детекции четырех мутаций (185delAG, 4153delA, 5382insC гена BRCA1 и 6174delT гена BRCA2) явился гетеродуплесный анализ и одной мутации (300T>G гена BRCA1) – анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов с последующим разделением продуктов в 2,0% агарозном геле методом горизонтального электрофореза [VoytasD., 2001]. Факты положительных мутаций подтверждались методом секвенирования на секвенаторе «3130 Genetic Analyzer» («Applied Biosystems», США). Параллельно мутация 5382insC гена BRCA1 в 94 образцах ДНК определялась с использованием набора «PRONTO® BRCA» («Savyon DiagnosticsLtd.», Израиль) и в 58 образцах – набором реагентов для выявления полиморфизмов в геноме «Мутация – 2 BRCA1 (5382insC)» («Литех», Россия), согласно инструкциям производителя.

Таблица 1. – Праймеры для определения мутаций гена BRCA1 (185delAG, 300T>G, 4153delA, 5382insC) и BRCA2 (6174 delT)

Мутация	Праймеры
185delAG 2 экзон гена BRCA1	F5' – GAA GTT GTC ATT TTA TAA ACC TTT – 3'* R5' – GTA TGT AAG GTC AAT TCT GTT C – 3'**
300T>G 5 экзон гена BRCA1	F5' – CTC TTA AGG GCA GTT GTG AG – 3' R5' – TTC CTA CTG TGG TTG CTT CC – 3'
4153delA 11 экзон гена BRCA1	F5' – AAG CCC GTT CCT CTT TGT CA – 3' R5' – TCC TAG CCC TTT CAC CCA TAC A – 3'
5382insC 20 экзон гена BRCA1	F5' – ATA TGA CGT GTC TGC TCC AC – 3' R5' – CCT TTC TGT CCT GGG GAT T – 3'
6174delT 11 экзон гена BRCA2	F5' – AAT GAT GAA TGT AGC ACG C – 3' R5' – ATA CCT GGA CAG ATT TTC CC – 3'

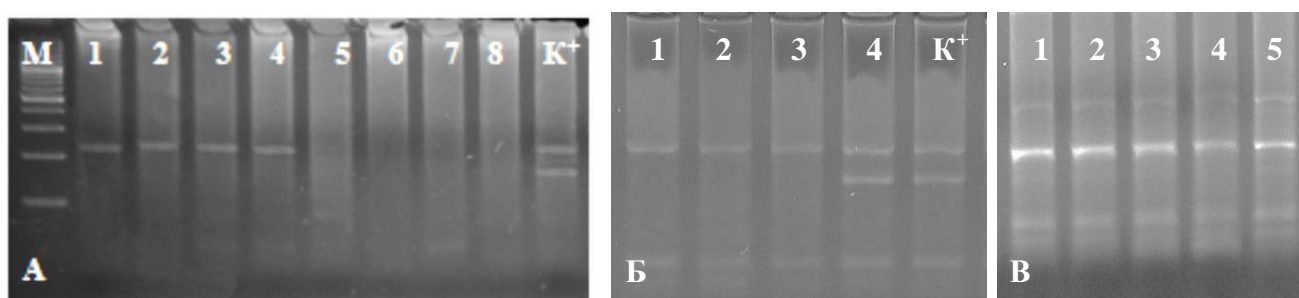
Иммуногистохимическое исследование рецепторного статуса (PЭ – рецепторы эстрогенов, PП – рецепторы прогестерона) и HER-2/neu выполнено у 370 пациенток с диагнозом РМЖ. Оценка показателей местного иммунитета (CD3, CD8, CD45RO, HLA-DR) и клеточного цикла (p53, cyclin D1) в опухолевой ткани 41 пациентки с диагнозом РМЖ проводилась по стандартным методикам одним патогистологом с применением антител фирмы «ДАКО» (Дания).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием стандартного пакета прикладных статистических программ Statistica 10.0 (СН АХАР207F394425FA-Q) и методов доказательной медицины.

Результаты собственных исследований

Научное обоснование методики определения мутаций 5382insC и 300T>G в гене BRCA1

При разработке методики, изначально экспериментальным путем подобрали количество реагентов, составляющих ПЦР-смесь: объем биологического субстрата с выделенной ДНК (рисунок 1) и 25 ммоль/л MgCl₂ (рисунок 2). При объеме субстрата с выделенной ДНК 1 мкл (рисунок 1.А) в пробах 5, 6, 7, 8 не визуализируется ДНК, а маркер молекулярного веса и гетеродуплекс положительного контрольного образца мутации 5382insC видны хорошо. На рисунке 1.В во всех пробах при объеме субстрата с выделенной ДНК, равном 3 мкл, визуализируется наличие примесей, имеющих бóльшую молекулярную массу, чем амплифицированный фрагмент ДНК. Таким образом, оптимальный объем стартовой ДНК равен 2 мкл (рисунок 1.Б).



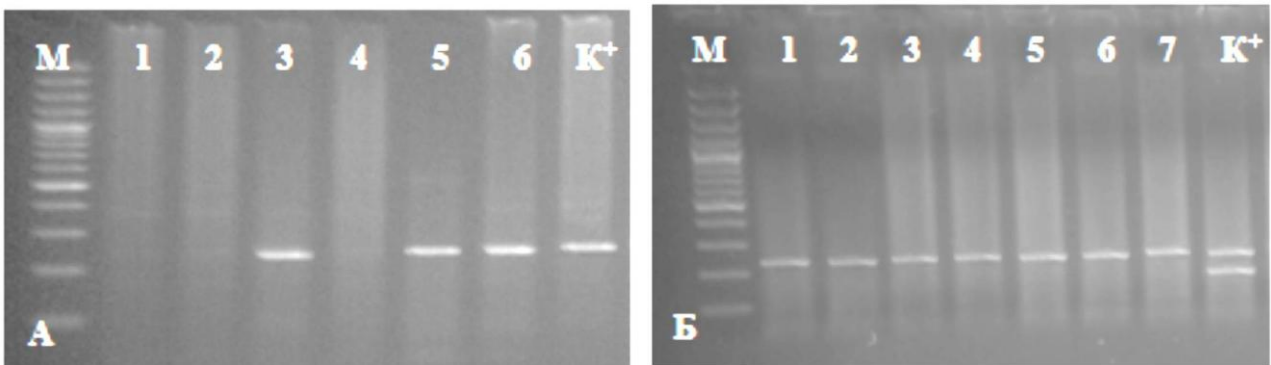
М – маркер молекулярного веса ДНК; **1-8** – исследуемые образцы ДНК; **K+** – положительный контрольный образец мутации 5382insC (**А** – количество ДНК 1 мкл; **Б** – количество ДНК 2 мкл; **В** – количество ДНК 3 мкл)

Рисунок 1. – Визуализация мутации 5382insC гена BRCA1 в 2% агарозном геле при разной концентрации стартовой ДНК

Количество 25 ммоль/л MgCl₂ 0,5 мкл привело к ингибированию ПЦР: в опытных пробах 1, 2 и 4 отсутствует искомый фрагмент ДНК (рисунок 2.А).

Оптимальным количеством 25 ммоль/л $MgCl_2$ стал объем 1,5 мкл, при котором в исследуемых пробах визуализируется ДНК без мутации, а в контрольном образце (K^+) обнаруживается гетеродуплекс (рисунок 2.Б).

Количество добавляемых праймеров, дНТФ, ПЦР-буфера и Taq-полимеразы было постоянным во всех пробах. В результате проведенных нами исследований подобран оптимальный состав реакционной ПЦР-смеси на 10 исследований, состоящий из следующих компонентов: 25,0 мкл ПЦР-буфера; 15,0 мкл 25 ммоль/л $MgCl_2$; 2,5 мкл 10 ммоль/л дНТФ; 10,0 мкл прямого праймера (F); 10,0 мкл обратного праймера (R); 0,6 мкл Taq-полимеразы; 166,9 мкл дистиллированной воды.



М – маркер молекулярного веса ДНК; **1-7** – исследуемые образцы ДНК;
К+ – положительный контрольный образец мутации 5382insC (**А** – количество 25 ммоль/л $MgCl_2$ 0,5 мкл, **Б** – количество 25 ммоль/л $MgCl_2$ 1,5 мкл)

Рисунок 2. – Визуализация мутации 5382insC гена BRCA1 в 2% агарозном геле при разном количестве 25 ммоль/л $MgCl_2$

Отсутствие стандартного протокола определения мутаций в генах BRCA методом ПЦР вызвало также необходимость оптимизации процедуры амплификации для конкретной последовательности нуклеотидов в праймерах. Нами была рассчитана температура отжига (T_a) и плавления (T_m) праймеров по самостоятельно подобранной последовательности нуклеотидов в них (таблица 1). Таким образом, T_m прямого и обратного праймеров для мутации 5382insC составила 64°C и 62°C, соответственно; T_a – 59°C и 57°C, соответственно. Для мутации 300T>G T_m прямого и обратного праймеров составила 64°C; T_a – 59°C. В связи с полученными данными настроили оптимальную температуру отжига праймеров, представленную в протоколе амплификации и прописанную в инструкции по применению [26].

Оценка лабораторно-диагностических свойств предложенной методики определения мутации 5382insC и сравнительный анализ стоимости одного исследования

С учетом того, что последовательность нуклеотидов прямого и обратного праймеров для определяемых мутаций нами подбирались самостоятельно, лабораторно-диагностические свойства предложенной методики определения мутации 5382insC оценили с использованием готовых тест-систем. В 58 образцах крови мутация 5382insC параллельно определялась набором реагентов для выявления полиморфизмов в геноме «Мутация – 2 BRCA1 (5382insC)» и в 94 образцах – набором «PRONTO® BRCA». Диагностическая чувствительность (ДЧ) определения мутации 5382insC методом ПЦР по предлагаемой методике с использованием праймеров «Праймтех» при применении набора «Мутация – 2 BRCA1 (5382insC)» составила 100,0% [72,5–100,0%], диагностическая специфичность (ДС) – 100,0% [94,9–100,0%], диагностическая эффективность (ДЭ) – 100,0% [91,5–100,0%], прогностическая значимость положительного результата (ПЗПР) составила 100,0% [72,5–100,0%], прогностическая значимость отрицательного результата (ПЗОР) – 100,0% [94,9–100,0%]. ДЧ предлагаемой нами методики при использовании набора «PRONTO® BRCA» составила 100,0% [77,0–100,0%], ДС – 98,8% [95,4–98,8%], ПЗПР – 92,3% [71,0–92,3%], ПЗОР – 100,0% [96,6–100,0%], ДЭ – 98,9% [93,1–98,9%]. Цена одного исследования мутации 5382insC при использовании реагентов ОДО «Праймтех» по отношению к цене фирмы «ЛИТЕХ» составила 28%; по отношению к цене одного исследования с использованием набора «PRONTO® BRCA» – 1,35% в пользу белорусского производителя.

Частота встречаемости и спектр мутаций в генах BRCA у лиц западного региона Беларуси

Частота встречаемости мутаций и их спектр имеют выраженные региональные особенности как у здоровых лиц, так и среди пациенток с диагнозом РМЖ и/или РЯ. Отсутствие данных о частоте и спектре мутаций в генах BRCA в западном регионе Беларуси определяет необходимость выполнения лабораторных скрининговых исследований в данном направлении [5]. Частота встречаемости мутаций в генах BRCA у пациенток с диагнозом РМЖ независимо от группы риска составила 3,8%, при этом преобладала мутация 5382insC гена BRCA1 – 64,7% [42,0–87,4%] случаев, на мутацию 4153delA гена BRCA1 пришлось 29,4% [7,7–51,1%] случаев и у одной пациентки была обнаружена мутация 6174delT гена BRCA2 (5,9% [0,0–16,4%]). Мутация 5382insC встречалась достоверно чаще, чем мутация 4153delA ($p=0,04$) и мутация 6174delT ($p=0,004$). Частота встречаемости мутаций у пациенток с первично-множественным раком (ПМР) молочной железы составила 8,6% и была достоверно выше, чем у пациенток без ПМР молочной железы – 2,7% ($p<0,02$). Мутации у пациенток с диагнозом РЯ независимо от группы риска встречались в 6,8% случаев, что достоверно не отличалось от

частоты встречаемости мутаций в 1-й группе ($p>0,05$), преобладала мутация 6174delT (44,5% [12,0–77,0%]).

Частота встречаемости мутаций генов BRCA в 3-й группе независимо от риска развития наследственного рака составила 15,3%. Все мутации распределились следующим образом: 47,3% [24,9–69,7%] случаев составила мутация 6174delT; 31,6% [10,7–52,5%] – 5382insC и 21,1% [2,7–39,9%] – 4153delA.

Частота встречаемости мутаций в генах BRCA у здоровых лиц из 4-й группы составила 2,4%. В 42,8% [8,5–77,1%] наблюдений была обнаружена мутация 6174delT гена BRCA2, в 57,2% [22,9–91,5%] – 5382insC в гене BRCA1. В 4-й группе частота встречаемости мутаций 5382insC и 6174delT практически не различалась и была достоверно выше, чем 4153delA ($p=0,01$ и $p=0,04$, соответственно). У лиц 4-й группы существенно реже встречается мутация 4153delA (0,0% [0,0–30,0%]).

Сопоставление частоты встречаемости мутаций в генах BRCA и риска развития онкопатологии

Частота встречаемости мутаций у пациенток с установленным диагнозом РМЖ в группе ВР составила 8,11%, в группе ПР – 4,83%, в группе ОтР – 2,51%. Частота встречаемости мутаций у пациенток с диагнозом РЯ в группе ВР – 22,2%, в группах ПР и ОтР – 6,25% и 6,49%, соответственно. Учитывая отсутствие достоверных различий между частотой выявления мутаций у пациенток из разных групп риска при одинаковой локализации опухоли (во всех случаях сравнений $p>0,05$), можно сделать вывод, что общепринятые критерии оценки риска наследственного РМЖ и/или РЯ не позволяют с достаточной надежностью определять контингент для целенаправленного проведения молекулярно-генетического исследования на наличие мутаций в генах BRCA.

Показания для направления пациенток с диагнозом РМЖ и РЯ, а также здоровых лиц на молекулярно-генетическое исследование мутаций в генах BRCA

Показанием для направления на исследование пациенток с диагнозом РМЖ является наличие среди родственников I–II степени родства еще одной женщины с диагнозом РМЖ, так как риск обнаружения мутаций у пациенток данной категории повышен и составляет 63,6% – атрибутивный риск (АР) и 2,66 – относительный риск (ОР); также наличие у пациентки ПМР молочной железы: вероятность выявления мутации у данных пациенток увеличена в 3,25 раза (АР=69,7%; ОР=3,25). Показаниями для направления на исследование пациенток с диагнозом РЯ являются существование среди родственников I–II степени родства трех и более случаев опухоли другой (кроме РЯ) локализации

и наличие в роду еще у одной женщины РЯ: риск обнаружения мутаций повышен и составляет $OR=4,0$ и $OR=3,31$, соответственно. Возраст возникновения РМЖ и/или РЯ у пациентки не может служить объективным показанием для направления пациенток с диагнозом РМЖ и/или РЯ на молекулярно-генетическое исследование мутаций в генах BRCA.

Показаниями для проведения молекулярно-генетического исследования у лиц без онкопатологии являются наличие среди родственников I–II степени родства диагноза РЯ или РМЖ и отсутствие другой онкопатологии в семье (риск обнаружения мутаций: $AR=79,3\%$; $OR=4,65$ и $AR=77,5\%$; $OR=4,45$, соответственно), а также существование двух и более родственников, у одной из которых обязательно РМЖ или РЯ (риск обнаружения мутаций: $AR=86,6\%$; $OR=7,47$ и $AR=89,6\%$; $OR=9,66$, соответственно). К вышеперечисленным показаниям для направления на молекулярно-генетическое исследование здоровых лиц следует добавить возраст на момент первичной диагностики РМЖ и/или РЯ у родственницы младше 44 лет (ДЧ – 51%; ДС – 73%). Согласно инструкции «Принципы организации и методы выявления лиц, имеющих наследственную предрасположенность к злокачественным новообразованиям», этот возрастной критерий соответствует 40 годам (ДЧ – 66%; ДС – 42%). Таким образом, при использовании данного критерия, 58% результатов будут оценены как ложноотрицательные.

Особенности рецепторного статуса у пациенток с BRCA-ассоциированным РМЖ

Для прогноза мутаций в генах BRCA нами оценена значимость экспрессии рецепторов эстрогенов (РЭ), прогестерона (РП) и HER-2/neu в опухолевых клетках молочной железы с помощью ROC-анализа. Поскольку во всех случаях ROC-анализа нижние границы доверительных интервалов менее 0,5 и $p>0,05$, следует считать, что показатели экспрессии РЭ, РП и HER-2/neu не являются надежными критериями для направления пациенток с диагнозом РМЖ на молекулярно-генетическое исследование мутаций в генах BRCA.

Местный иммунитет при BRCA-ассоциированном РМЖ

При анализе связи между наличием мутаций в генах BRCA у пациенток с диагнозом РМЖ и степенью экспрессии клеток с фенотипами CD3+ и CD8+ в строме молочной железы было установлено, что процент интратуморальных CD3+ и CD8+ клеток достоверно выше у пациенток с диагнозом РМЖ при наличии мутации в генах BRCA (60% (40–80%) и 40% (40–50%), соответственно), чем у пациенток без мутации в данных генах (30% (10–45%) и 22,5% (7,5–40%), соответственно), Mann-Whitney U Test: $p=0,05$ и $p=0,02$, соответственно (рисунки 3,4).

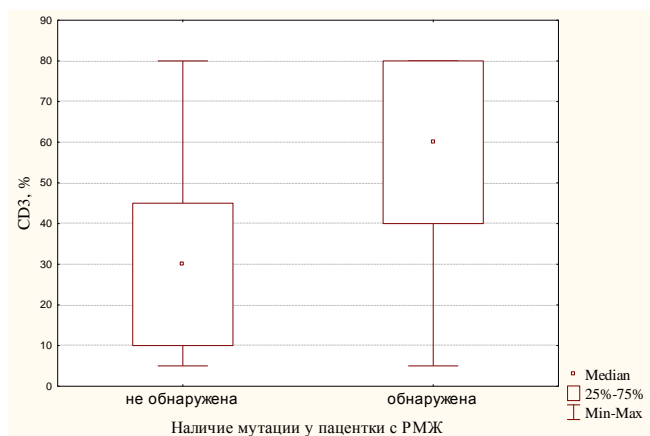


Рисунок 3. – Связь между экспрессией CD3+ и наличием мутации у пациентки с РМЖ

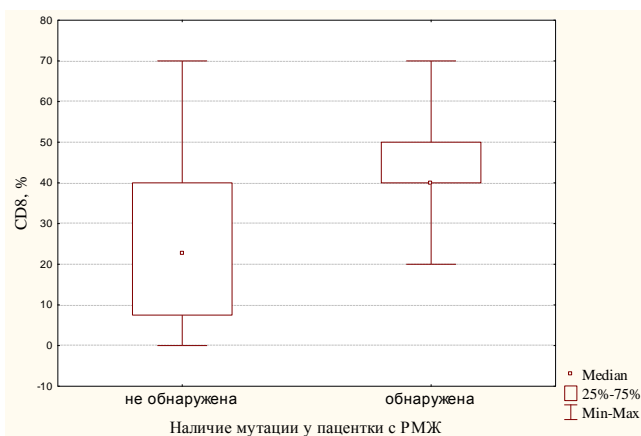


Рисунок 4. – Связь между экспрессией CD8+ и наличием мутации у пациентки с РМЖ

Более выраженная инфильтрация ткани опухоли Т-хелперами и Т-киллерами может быть объяснена более высокой иммуногенностью опухолей, ассоциированных с мутациями в генах BRCA, и быть использована в иммунотерапии наследственного РМЖ.

При построении с помощью дискриминантного анализа модели для прогноза наличия мутаций в генах BRCA у пациенток с диагнозом РМЖ было установлено, что из 14 изученных факторов достоверно влияют на прогноз 4: интенсивность инфильтрации опухоли лимфоцитами с фенотипами CD3+ и CD8+, наличие у родственников I–II степени родства РМЖ и размер опухоли. ДЧ дискриминантной модели составляет 83,3%, ДС – 95,8% [27].

Высокая иммуногенность опухоли, ассоциированной с мутациями в генах BRCA, подтверждается наличием признаков активации внутриопухолевых лимфоцитов (рисунок 5): отсутствием достоверной связи между экспрессией p53 и инфильтрацией опухоли клетками-мигрантами (с фенотипом CD45RO+) ($R=0,25$; $p=0,6$), а также тем, что показатель активации лимфоцитов HLA-DR входит в один кластер с показателями экспрессии CD3 и CD8 ($p<0,05$).

Иная картина наблюдается при спорадическом РМЖ (рисунок 6): количество лимфоцитов в опухоли достоверно меньше, чем при BRCA-ассоциированном РМЖ, показатель активации лимфоцитов HLA-DR не вошел ни в один из кластеров. Таким образом, при спорадическом РМЖ опухоль инфильтрируют неактивные клетки-мигранты, вследствие чего показатели местного иммунитета и факторы, определяющие пролиферативную активность раковых клеток, напрямую не связаны между собой ($p<0,05$).

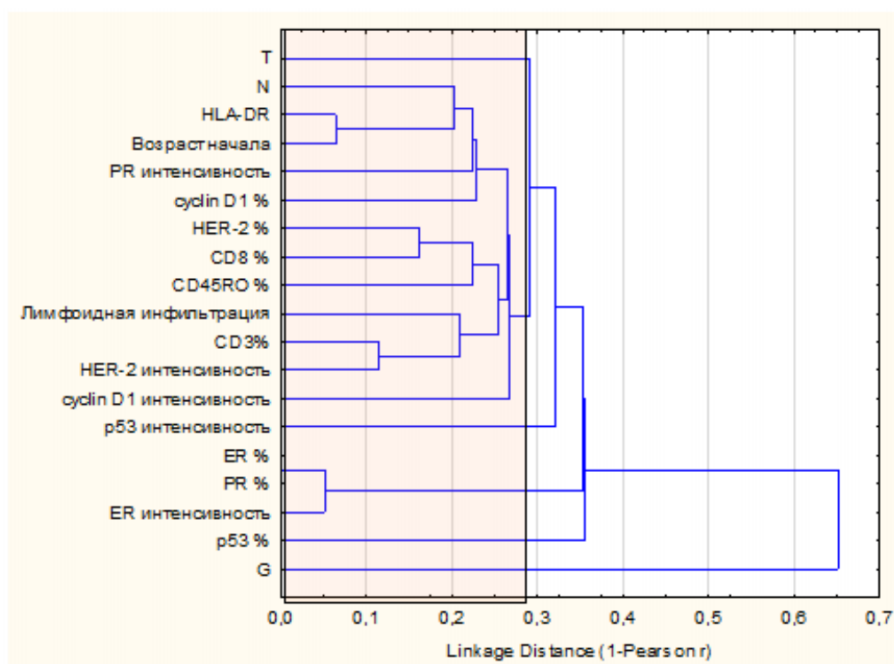


Рисунок 5. – Дендрограмма, характеризующая связи изученных показателей при наследственном РМЖ. В красной зоне значения R достоверны ($p < 0,05$)

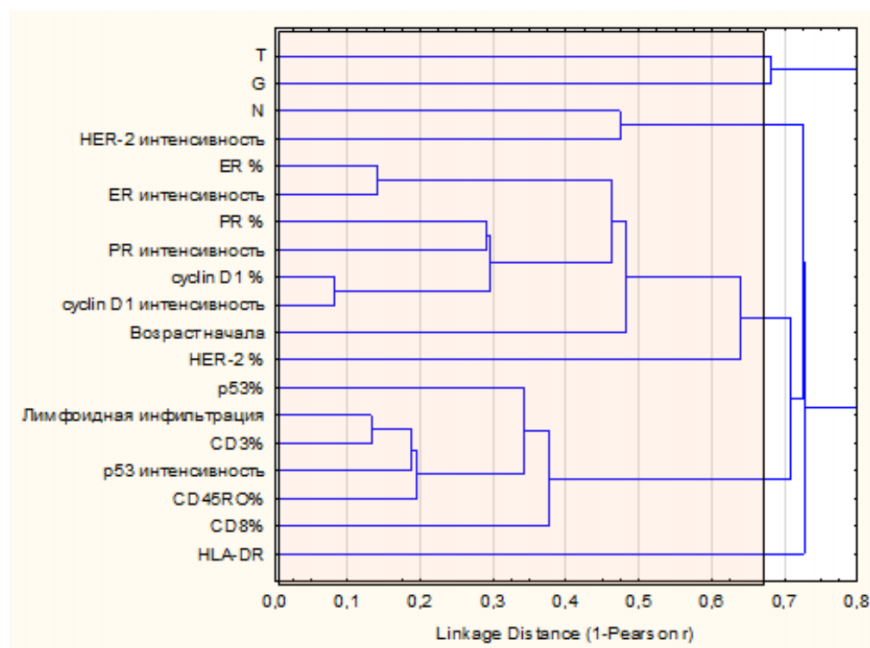


Рисунок 6. – Дендрограмма, характеризующая связи изученных показателей при sporadicческом РМЖ. В красной зоне значения R достоверны ($p < 0,05$)

Прогнозирование трехлетней выживаемости и возврата болезни при раке молочной железы

При построении дискриминантной модели для прогнозирования трехлетней выживаемости пациенток с диагнозом РМЖ было установлено, что

из 14 исходно включенных для анализа показателей существенную связь с прогнозом трехлетней выживаемости продемонстрировали только 8, а именно: характеристики местного иммунитета в опухолевой ткани молочной железы (CD3, CD8, CD45RO, HLA-DR в строме, отношение CD8/CD45RO, выраженность лимфоидной инфильтрации), размер опухоли согласно классификации TNM и наличие у пациентки мутации в генах BRCA. Анализ классификационной матрицы, значение Wilks' – Lambda, равное 0,23; значение F-критерия, равного 5,95 ($p < 0,001$), позволяют сделать вывод о том, что данная классификация является корректной. ДЧ предлагаемой дискриминантной модели прогнозирования трехлетней выживаемости пациенток с диагнозом РМЖ составляет 87,5%, ДС – 100%.

При построении дискриминантной модели для прогноза возврата заболевания в течение трех лет от момента постановки диагноза РМЖ было установлено, что из 14 проанализированных показателей значимое влияние на прогноз оказывают 11; 7 из которых характеризуют местный иммунный ответ в ткани опухоли, а также такие показатели, как возраст на момент диагностики РМЖ, размер опухоли, степень поражения регионарных лимфатических узлов и наличие мутации в генах BRCA у пациентки с диагнозом РМЖ. В подтверждение того, что классификационная матрица является корректной: значение Wilks' – Lambda – 0,19; значение F-критерия – 3,48 ($p = 0,035$). ДЧ предлагаемой дискриминантной модели – 93,3%, ДС – 100%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Предлагаемая методика определения мутации в онкогене BRCA1 (5382insC) методом полимеразной цепной реакции с электрофоретической схемой детекции с использованием подобранной последовательности нуклеотидов праймеров и реагентов «Праймтех» является высокоспецифичной и эффективной: параллельное определение мутации набором НТФ «Литех» показало совпадение результатов в 100% случаев, набором «PRONTO® BRCA» – в 98,8% случаев [8, 22].

2. Частота встречаемости мутаций в генах BRCA у пациенток с диагнозом РМЖ без учета наследственной отягощенности составляет 3,8%, характерной для BRCA-ассоциированного РМЖ у женщин западного региона Беларуси является мутация 5382insC в гене BRCA1, частота ее встречаемости среди всех положительных мутаций составляет 64,7% [42,0–87,4%]. Данная мутация встречается достоверно чаще, чем 4153delA гена BRCA1 ($p = 0,04$) и 6174delT гена BRCA2 ($p = 0,004$). Частота встречаемости мутаций у пациенток с диагнозом РЯ без учета наследственной отягощенности – 6,8%; различия в частоте встречаемости мутаций статистически не достоверны ($p > 0,05$). Частота

встречаемости мутаций у здоровых лиц без наследственной отягощенности составляет 2,4%, у здоровых лиц при наличии РМЖ и/или РЯ в роду – 15,3% [1, 2, 10, 11, 12, 16, 23, 24].

3. Учитывая низкую частоту обнаружения мутаций в генах BRCA, высокую стоимость и сложность проведения полноценной диагностики BRCA мутаций у всего контингента женщин, показанием для направления на молекулярно-генетическое исследование мутаций в генах BRCA пациенток с диагнозом РМЖ является существование в семье еще одной женщины с диагнозом РМЖ (АР=63,6%; ОР=2,66) и наличие у пациентки первично-множественного рака молочной железы (АР=69,7; ОР=3,25); при направлении пациенток с диагнозом РЯ – наличие среди родственников I–II степени родства еще одной женщины, страдающей РЯ (АР=69,8%; ОР=3,31), три и более случаев онкопатологии (исключая РЯ) в семье (АР=74,9%; ОР=4,0). Показанием для направления здоровых лиц на исследование является существование одной родственницы с диагнозом РЯ или РМЖ (АР=79,3%; ОР=4,65 и АР=77,5%; ОР=4,45, соответственно); наличие двух и более родственниц I–II степени родства, у одной из которых обязательно РМЖ (АР=86,6%; ОР=7,47) или РЯ (АР=89,6%; ОР=9,66) и возраст на момент первичной диагностики РМЖ и/или РЯ у члена семьи младше 44 лет (чувствительность – 51%, специфичность – 73%) [3, 4, 14, 17, 25].

4. Впервые установлено, что при раке молочной железы, ассоциированном с мутациями в генах BRCA, более интенсивная инфильтрация опухоли клетками с фенотипами CD3+ и CD8+ (на 30% $p=0,05$ и 17,5%, $p=0,02$, соответственно). Показатели экспрессии PЭ, РП и HER-2/neu не являются надежными показателями для направления пациенток с диагнозом РМЖ на молекулярно-генетическое исследование мутаций в генах BRCA (во всех случаях ROC-анализа нижние границы доверительных интервалов менее 0,5 и $p>0,05$), более надежной характеристикой для прогноза наличия мутаций в генах BRCA выступает интенсивность инфильтрации опухоли лимфоцитами с фенотипами CD3+ и CD8+ (чувствительность – 83,3%, специфичность – 95,8%) [6, 15].

5. На прогноз трехлетней выживаемости пациенток с диагнозом РМЖ достоверно влияют наличие мутации в генах BRCA, размер опухоли, а также показатели местного иммунного ответа в ткани опухоли: процент клеток с фенотипами CD3+, CD8+, CD45RO+, интенсивность экспрессии HLA-DR и лимфоидная инфильтрация ($p<0,001$; диагностическая чувствительность модели – 87,5%, диагностическая специфичность – 100%); на прогноз возврата болезни оказывают влияние такие показатели, как лимфоидная инфильтрация, процент лимфоцитов с фенотипами CD8+, CD45RO+, HLA-DR, а также возраст на момент диагностики заболевания, размер опухоли и степень поражения

регионарных лимфатических узлов ($p=0,035$; диагностическая чувствительность модели – 93,3%, диагностическая специфичность – 100%) [7, 9, 18, 19, 20, 21].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Для прогноза наличия мутации в генах BRCA у пациенток с диагнозом РМЖ с целью формирования онкологической группы риска, состоящей из их здоровых родственников, для проведения молекулярно-генетических исследований у родственников, не имеющих онкологических заболеваний, может быть использована формула 1:

$$y = - 0,137 * m1 - 0,069 * m2 + 5,302 * m3 - 3,071 * m4 + 14,0 \quad (1),$$

где $m1$ – процент клеток с фенотипом CD3+ в опухолевой ткани молочной железы;

$m2$ – процент клеток с фенотипом CD8+ в опухолевой ткани молочной железы;

$m3 = 1$ при наличии у родственников I–II степени родства РМЖ, $m3 = 0$ при отсутствии РМЖ у родственников I–II степени родства;

$m4 = 1, 2, 3$ или 4 по оценке первичной опухоли молочной железы согласно Международной клинической классификации TNM.

При $y \leq 0$, прогнозируют наличие мутации в генах BRCA у пациенток с диагнозом РМЖ, при $y > 0$ – отсутствие мутации в генах BRCA у пациенток с РМЖ. Чувствительность метода – 83,3%, специфичность – 95,8% [6,27].

2. Предложена методика для определения мутаций 300T>G и 5382insC (5 и 20 экзон) гена BRCA1 методом полимеразной цепной реакции с электрофоретической схемой детекции. Данная методика с применением реагентов белорусского производителя может использоваться при проведении скрининговых исследований в клинической лабораторной диагностике. Разница в стоимости одного определения мутации 5382insC при использовании реагентов ОДО «Праймтех» относительно стоимости определения мутации набором «Литех» составляет 28%, набором «PRONTO® BRCA» – 1,35% в пользу белорусского производителя, что позволяет использовать данную методику для проведения скрининговых исследований в клинической лабораторной диагностике [26].

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в журналах

1. Частота выявления мутаций гена BRCA1 при раке молочной железы и яичника у пациентов Гродненской области / С. Э. Савицкий, О. Е. Кузнецов, С. А. Ляликов, И. А. Курстак // Онкологический журнал. – 2011. – Т.4. – № 2. С. 29–32.
2. Частота мутаций гена BRCA и клинический риск при наследственных опухолях женской репродуктивной системы / О. Е. Кузнецов, С. А. Ляликов, С. Э. Савицкий, И. А. Курстак // Здоровоохранение. – 2011. – № 4. С. 71–74.
3. Прогностическая значимость клинико-генетических признаков в диагностике предрасположенности к наследственному раку молочной железы и яичников у здоровых лиц в белорусской популяции / И. А. Курстак, С. А. Ляликов, О. Е. Кузнецов, М. В. Ершова // Журнал Гродн. гос. мед. университета. – 2013. – №1(41). С. 34–36.
4. Прогностическая значимость клинико-генетических признаков в диагностике наследственного генеза опухолей у пациенток с раком молочной железы и яичников / И. А. Курстак, С. А. Ляликов, М. В. Ершова, В. В. Кеда // Онкологический журнал. – 2013. – Vol. 7. – №2(26). С. 81–85.
5. Курстак, И. А. Наследственный рак молочной железы и яичников / И. А. Курстак // Медицинская панорама. – 2013. – №4(139). С. 32–37.
6. Прогнозирование мутации в генах BRCA у пациенток с раком молочной железы / И. А. Курстак, С. А. Ляликов, О. Е. Кузнецов, М. В. Ершова // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2014. – № 1(9). С. 24–30.
7. Прогностическая значимость показателей клеточного цикла и факторов внутриопухолевого иммунного ответа при раке молочной железы / С. А. Ляликов, И. А. Курстак, О. Е. Кузнецов, В. В. Цитко, А. В. Шульга // Вести НАН Беларуси. Серия мед. наук. – 2014. – №1. С. 38–45.
8. Определение мутации 5382INSC гена BRCA1 методом полимеразной цепной реакции с электрофоретической схемой детекции / И. А. Курстак, С. А. Ляликов, О. Е. Кузнецов, М. В. Ершова, С. В. Гонтарев // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2015. – № 2(14). С. 77–86.
9. Курстак, И. А. Прогнозирование трехлетней выживаемости и рецидива заболевания при раке молочной железы по показателям, отражающим состояние местного иммунитета в опухолевой ткани / И. А. Курстак // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2015. – № 3-4(15-16). С. 148–158.

Статьи в научных сборниках и материалах конференций

10. Кузнецов, О. Е. Частота выявления мутаций гена BRCA1 при раке молочной железы и яичника у пациентов Гродненской области / О. Е. Кузнецов, И. А. Курстак // «Научные стремления – 2010». Сборник материалов Респ. научно–практ. молодежной конференции с междун. участием, часть I., Минск, 3 ноября 2010 г. – Минск, 2010. – С. 458–461.

11. Выявление генетически детерминированного рака молочной железы и рака яичников / С. Э.Савицкий, С. А. Ляликов, О. Е.Кузнецов, И. А. Курстак, В. А. Басинский // Материалы республиканской научно–практической конференции «Актуальные проблемы патологической анатомии», Гродно, 26 ноября 2010 г. – Гродно: ГрГМУ, 2010. – С. 121–123.

12. Частота мутаций гена BRCA у пациентов госпитального скрининга при наследственных опухолях женской репродуктивной системы / И. А. Курстак, О. Е. Кузнецов, С. А. Ляликов, С. Э. Савицкий // Материалы VIII международной медико-фармацевтической конференции студентов и молодых ученых (85-й ежегодный научный форум). – Черновцы, 2011. – С. 124–125.

13. Компьютерная диагностическая информационно-аналитическая система в работе центра диагностики наследственных опухолей / И. А. Курстак, С. А. Ляликов, С. Э. Савицкий, О. Е. Кузнецов // Вопросы организации и информатизации системы здравоохранения. Материалы респ. научно-практической конференции с международным участием «Современные вопросы организации и информатизации здравоохранения», Минск, 19 октября 2012 г. – С. 265–268.

14. Курстак, И. А. Значение онкологического анамнеза в прогнозировании наследственного рака молочной железы и яичников / И. А. Курстак // Сборник материалов 77-й итоговой студенческой научно-практической конференции с междунар. участием, посвящ. 90-летию со дня рождения профессора П.Г.Макарова и доцента Б. М. Зельмановича, Красноярск, 23–26 апреля 2013 г. – Красноярск: КрасГМУ, 2013. – С. 510–512.

15. Особенности рецепторного статуса у пациенток с наследственным раком молочной железы в белорусской популяции / И. А. Курстак, С. А. Ляликов, А. В. Шульга, О. Е. Кузнецов // Материалы научно-практической конференции, посвященной 55-летию учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет» «Актуальные проблемы медицины», Гродно, 3–4 октября 2013 г. – Гродно: ГрГМУ, 2013. – С. 384–387.

Тезисы докладов

16. Курстак, И. А. Мутации гена BRCA1 в белорусской популяции / И. А. Курстак // Материалы конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора М. П. Шейбака, Гродно, 14–15 апреля 2011 г. – Гродно: ГрГМУ, 2011. – С. 254.

17. Курстак, И. А. Оценка значения первичной множественности новообразований у пациенток с раком молочной железы при прогнозировании мутаций в генах BRCA / И. А. Курстак // Материалы конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора М. В. Кораблева 18–19 апреля 2013 г. – Гродно: ГрГМУ, 2013. – С. 252–253.

18. Особенности экспрессии интрамуральных клеток с фенотипом CD3+ при наследственном раке молочной железы / И. А. Курстак, С. А. Ляликов, О. Е. Кузнецов, А. В. Шульга // Материалы ежегодной научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицины», Гродно, 23 января 2014 г. – Гродно: ГрГМУ, 2014. – С. 132.

19. Прогностическая значимость показателей клеточного цикла и местного иммунного ответа при раке молочной железы / И. А. Курстак, С. А. Ляликов, О. Е. Кузнецов, А. В. Шульга // Материалы ежегодной научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицины», Гродно, 23 января 2014 г. – Гродно: ГрГМУ, 2014. – С. 133.

20. Связь интрамуральных клеток с фенотипом CD3+ при раке молочной железы с отягощенным онкологическим анамнезом / И. А. Курстак, С. А. Ляликов, О. Е. Кузнецов, А. В. Шульга // Материалы ежегодной научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицины», Гродно, 23 января 2014 г. – Гродно: ГрГМУ, 2014. – С. 134.

21. Связь клинических показателей с результатами морфологического обследования опухоли при sporadic и наследственном раке молочной железы / И. А. Курстак, С. А. Ляликов, О. Е. Кузнецов, А. В. Шульга // Материалы ежегодной научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицины», Гродно, 23 января 2014 г. – Гродно: ГрГМУ, 2014. – С. 135.

22. Курстак, И. А. Оценка диагностической эффективности предлагаемого способа определения мутации 5382insc методом полимеразной цепной реакции / И. А. Курстак, В. Ю. Климук, А. А. Набока // Материалы конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора Ю. Г. Бойко, 23–24 апреля 2015 г. – Гродно : ГрГМУ, 2015. – С. 258–259.

23. Kurstak, I. «Founder» BRCA1 gene mutations frequency in the population of Belarus / I. Kurstak, O. Kuznetsov, S. Lalikov // Abstract book of the 19th international student scientific conference for students and young doctors, Gdansk, 12–14 may 2011 y. Medical University of Gdansk. – Gdansk, 2011. – P. 121.

24. Kurstak, I. Frequency of the mutation BRCA gene in patients with breast and ovarian cancer / I. Kurstak, O. Kuznetsov // Abstract book of the 19th international student scientific conference for students and young doctors, Gdansk, 12–14 may 2011 y. Medical University of Gdansk. – Gdansk, 2011. – P. 120.

25. Kurstak, I. Assessment of the breast cancer and/or ovary cancer emergence age significance in the relative in BRCA genes mutation / I. Kurstak, S. Lalikov // Abstract book of the 21th international student scientific conference for students and young doctors, Gdansk, 23–25 may 2013 y. Medical University of Gdansk. – Gdansk, 2013. – P. 112.

Инструкция по применению

26. Молекулярно-генетическая диагностика мутаций в онкогене BRCA1 (300T>G, 5382insC) у пациентов с раком молочной железы и раком яичника методом полимеразной цепной реакции. Инструкция по применению / И. А. Курстак, О. Е. Кузнецов, С. А. Ляликов, С. Э. Савицкий, В. В. Воробьев // Регистрационный № 064-0611 от 30.09.2011. – Гродно : ГрГМУ, 2011. – 8 с.

Приоритетная справка на изобретение

27. Способ прогнозирования мутации в генах BRCA у пациенток с раком молочной железы / И. А. Курстак, С. А. Ляликов, С. Э. Савицкий, О. Е. Кузнецов (приоритетная справка № А20131623 от 30.12.2013).



РЭЗІЮМЭ**Курстак Ірына Андрэеўна**

Прагнаванне рызыкі развіцця і асаблівасцяў клінікі раку малочнай залозы на падставе распрацаванага скрынінгавага метаду выяўлення мутацый у генах BRCA і паказчыкаў інтратумаральнага імуннага адказу

Ключавыя словы: рак малочнай залозы, мутацыя, BRCA, методыка вызначэння, мясцовы імунітэт.

Аб'ект даследавання: даныя анкетавання 16911 рэспандэнтаў, узоры вянознай крыві 581 пацыента з дыягназам рак малочнай залозы і/або рак яечнікаў і 417 чалавек, якія не маюць анкалагічных захворванняў, а таксама ўзоры тканкі пухліны 370 пацыентак з дыягназам рак малочнай залозы.

Прадмет даследавання: мутацыі ў генах BRCA, якія вызначаюць спадчынную схільнасць да раку малочнай залозы і раку яечнікаў, паказчыкі інтратумаральнага імуннага адказу, клеткавага цыклу і рэцэптарнага статусу пухліны пры спадчынна-абумоўленым і спарадычным раку малочнай залозы.

Мэта работы: распрацаваць на аснове прапанаваных новых праймераў скрынінгавую методыку выяўлення мутацый у генах BRCA і вызначыць значнасць малекулярна-генетычных парушэнняў і асаблівасцяў інтратумаральнага імуннага адказу для ацэнкі рызыкі ўзнікнення і прагнозу развіцця рака малочнай залозы.

Метады даследавання: малекулярна-генетычныя, папуляцыйна-генетычныя, імунагістахімічныя, статыстычныя.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Распрацавана дыягнастычна і эканамічна эфектыўная методыка полімеразнай ланцуговай рэакцыі для вызначэння мутацый у гене BRCA на аснове прапанаваных новых праймераў і рэагентаў беларускага вытворцы. Вызначаны частата сустракаемасці і спектр мутацый генаў BRCA ў пацыентак з дыягназам рак малочнай залозы і/або яечнікаў і ў здаровых жыхароў заходняга рэгіёну Беларусі. Упершыню праведзена комплексная ацэнка значнасці паказчыкаў інтратумаральнага імуннага адказу, клеткавага цыклу і рэцэптарнага статусу пухліны пры раку малочнай залозы для прагнозу бегу захворвання ў пацыентак з мутацыяй у генах BRCA.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: для ўжывання ў клініка-дыягнастычных лабараторыях і аддзяленнях анкалагічнага профілю.

Галіна прымянення: клінічная лабараторная дыягностыка, анкалогія.

РЕЗЮМЕ**Курстак Ирина Андреевна****Прогнозирование риска развития и особенностей течения рака молочной железы на основании разработанного скринингового метода выявления мутаций в генах BRCA и показателей интратуморального иммунного ответа**

Ключевые слова: рак молочной железы, мутация, BRCA, методика определения, местный иммунитет.

Объект исследования: данные анкетирования 16911 респондентов, образцы венозной крови 581 пациентки с диагнозом рак молочной железы и/или рак яичников и 417 человек, не имеющих онкологических заболеваний, а также образцы ткани опухоли 370 пациенток с диагнозом рак молочной железы.

Предмет исследования: мутации в генах BRCA, определяющие наследственную предрасположенность к раку молочной железы и раку яичников, показатели интратуморального иммунного ответа, клеточного цикла и рецепторного статуса опухоли при наследственно-обусловленном и спорадическом раке молочной железы.

Цель исследования: разработать на основе предложенных новых праймеров скрининговую методику выявления мутаций в генах BRCA и определить значимость молекулярно-генетических нарушений и особенностей интратуморального иммунного ответа для оценки риска возникновения и прогноза развития рака молочной железы.

Методы исследования молекулярно-генетические, популяционно-генетические, иммуногистохимические, статистические.

Полученные результаты и их новизна. Разработана диагностически и экономически эффективная методика полимеразной цепной реакции для определения мутаций в гене BRCA на основе предложенных новых праймеров и реагентов белорусского производителя. Определены частота встречаемости и спектр мутаций генов BRCA у пациенток с диагнозом рак молочной железы и/или яичников и у здоровых жителей западного региона Беларуси. Впервые произведена комплексная оценка значимости показателей интратуморального иммунного ответа, клеточного цикла и рецепторного статуса в опухолевой ткани при раке молочной железы для прогноза течения заболевания у пациенток с мутацией в генах BRCA.

Рекомендации по использованию: для внедрения в клинико-диагностических лабораториях и отделениях онкологического профиля.

Область применения: клиническая лабораторная диагностика, онкология.

SUMMARY

Kurstak Iryna

Predicting risk of development and characteristics of breast cancer by using the developed screening method to identify mutations in the BRCA genes and indicators of intratumoral immune response

Key words: breast cancer, mutation, BRCA, identification technique, local immunity.

Object of research: survey data of 16,911 respondents, venous blood samples from 581 patients with breast cancer and/or ovarian cancer and 417 people without cancer as well as tumor tissue samples from 370 patients with breast cancer.

Subject of research: BRCA genes mutations determining genetic predisposition to breast and ovarian cancer, indicators of intratumoral immune response, cell cycle and receptor status of tumors in hereditary and sporadic breast cancer.

Purpose of research: to develop a screening technique to identify mutations in BRCA genes on the basis of the proposed new primers and to determine the significance of molecular genetic disorders and features of intratumoral immune response for risk assessment and prognosis of breast cancer development.

Methods of research: molecular genetic testing, population genetic testing, immunohistochemical method, statistics.

The obtained results and their novelty. We developed a diagnostic and cost-effective technique of polymerase chain reaction to determine BRCA gene mutations based on the proposed new primers and reagents from Belarusian manufacturer. The prevalence and spectrum of BRCA gene mutations in patients with breast and/or ovarian cancer and in healthy residents of Western Belarus were determined. A comprehensive assessment of the significance of indicators of intratumoral immune response, cell cycle and receptor status of tumor tissue in breast cancer for prediction of the course of the disease in patients with mutation in BRCA genes was performed for the first time.

Recommendations for use: for implementation in clinical diagnostic laboratories and oncology departments.

Field of application: clinical laboratory diagnostics, oncology.

Научное издание

КУРСТАК Ирина Андреевна

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РИСКА РАЗВИТИЯ И ОСОБЕННОСТЕЙ
ТЕЧЕНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ОСНОВАНИИ
РАЗРАБОТАННОГО СКРИНИНГОВОГО МЕТОДА ВЫЯВЛЕНИЯ
МУТАЦИЙ В ГЕНАХ BRCA И ПОКАЗАТЕЛЕЙ
ИНТРАТУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

по специальности 14.03.10 – клиническая
лабораторная диагностика

Подписано в печать
Формат 60x84/16. Бумага офсетная.
Гарнитура Таймс. Ризография.
Усл. печ. л. **1,40**. Уч.-изд. л. **1,26**. Тираж **70** экз. Заказ **3**.

Издатель и полиграфическое исполнение
учреждение образования

«Гродненский государственный медицинский университет».
ЛП № 02330/445 от 18.12.2013. Ул. Горького, 80, 230009, Гродно.