

Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр онкологии и
медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

УДК 618.19-006.6: 616.428-037 (476)

СУБОЧ
Елена Ивановна

**ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ
КАК МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ
ОНКОГЕНА HER-2/NEU У ПАЦИЕНТОК,
СТРАДАЮЩИХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук
по специальности 14.01.12 – онкология

Минск, 2015

Научная работа выполнена в Государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

- Научный руководитель:** Машевский Александр Альфредович, доктор медицинских наук, профессор, врач-онколог центральной экспертной комиссии по раннему выявлению онкологических заболеваний организационно-методического отделения Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»
- Научный консультант:** Усанов Сергей Александрович, доктор химических наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси, директор Института биоорганической химии НАН Беларуси
- Официальные оппоненты:** Демидчик Юрий Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой онкологии Государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»
- Таганович Анатолий Дмитриевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологической химии Учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»
- Оппонирующая организация:** Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Защита состоится «4» ноября 2015 г. в 14 ч. на заседании совета по защите диссертаций Д 03.12.01 при Государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» (223040, Минский р-н, агр. Лесной, E-mail: NArtemova@omr.med.by, тел. +375172879561).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова».

Автореферат разослан «___» октября 2015 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций
доктор медицинских наук, доцент

Н.А. Артемова

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее частой злокачественной опухолью среди женского населения экономически развитых стран [Bombonati A. et al., 2011]. В Республике Беларусь частота данной патологии в структуре онкологической заболеваемости в 2013 г. составила 17,6% [Океанов А.Е. и соавт., 2014].

На сегодняшний день РМЖ рассматривается как одно из наиболее гетерогенных онкологических заболеваний. Для определения адекватной тактики лечения используется молекулярно-генетическая классификация, либо ее упрощенный гистохимический вариант, который учитывает статус рецепторов эстрогенов и прогестерона, уровни экспрессии онкопротеина HER-2/neu и маркера клеточной пролиферации Ki-67 (люминальный А, люминальный В (HER2-негативный и HER2-позитивный), HER2-позитивный (не люминальный) и трижды негативный). Каждый из перечисленных подтипов РМЖ характеризуется определенным биологическим поведением, прогнозом и особенностями ответа на системную противоопухолевую терапию [Perou C.M. et al., 2000; Cheang M.C. et al., 2009; Parker J.S., 2009; Wo J.Y. et al., 2010; Phipps A. et al., 2011; Семиглазов В.Ф. и соавт., 2012].

HER-2/neu является одним из опухолевых маркеров, используемых для выделения молекулярных подтипов РМЖ. Амплификация онкогена и/или гиперэкспрессия онкопротеина HER-2/neu выявляется в 15–30% случаев РМЖ [Семенова А.И., 2010; Staaf J. et al., 2010; Weigel M.T. et al., 2010; Gutierrez C. et al., 2011]. Высокий уровень активации маркера относится к неблагоприятным прогностическим факторам и коррелирует с большим размером опухоли, метастатическим поражением лимфатических узлов, низкой степенью дифференцировки, отсутствием рецепторов к эстрогенам и прогестерону [Ross J. et al., 2009; Tagliabue E. et al., 2010; Baselga J. et al., 2012]. Однако не все исследователи отмечают наличие этой закономерности [Mustacchi G. et al., 2007; Rosa F.E. et al., 2009].

Индивидуальный подход к выбору специального лечения в каждом конкретном случае, в том числе к назначению дорогостоящих и, зачастую, токсичных мишень-направленных препаратов, диктует необходимость выбора оптимальных диагностических подходов в определении HER2-статуса [Имянитов Е.Н., 2010; Hammond M.E. et al., 2011; Olsson H. et al., 2013].

В настоящее время наиболее точными методами оценки активации HER-2/neu являются технологии флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) и хромогенной *in situ* гибридизации (CISH), позволяющие определять уровень амплификации онкогена. Однако отсутствие специального оборудования и высокая стоимость реагентов ограничивают рутинное использование FISH. В случае более рентабельного CISH-тестирования приходится полагаться на субъективную интерпретацию полученных результатов [Завалишина Л.Э. и соавт., 2006; Wolff A.C. et al., 2007;

Sauter G. et al., 2009; Ross J. et al., 2009; Имянитов Е.Н., 2010; Франк Г.А. и соавт., 2012].

На практике до настоящего времени доминирующее положение принадлежит иммуногистохимическому (ИГХ) анализу. Несомненными достоинствами технологии являются высокая информативность и доступность, однако метод является полуколичественным. Высока также вероятность получения некорректных результатов из-за недостаточной стандартизации метода и его технического несовершенства (деградация антигена-мишени вследствие неадекватной консервации образцов, разная чувствительность антител различных производителей и др.). Кроме того, учет результатов тестирования носит субъективный характер и напрямую зависит от квалификации врача-патологоанатома [Cuadros M. et al., 2009; Имянитов Е.Н., 2010; Иванцов А.О. и соавт., 2011; Fisher С., 2011; Hammond M.E. et al., 2011; Франк Г.А. и соавт., 2012; Collins R. et al., 2012].

Хорошие результаты получены при использовании протоколов определения статуса онкогена HER-2/neu по уровню экспрессии матричной РНК (мРНК), основанных на применении метода количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Преимуществами технологии являются воспроизводимость, рентабельность, возможность получения количественного результата при минимальном содержании мРНК в пробе, а также возможность автоматической регистрации и интерпретации полученных данных. В проведенных исследованиях отмечена высокая специфичность HER2-тестирования на основе использования ПЦР (до 100%) [Baehner F.L. et al., 2010; Susini T. et al., 2010; Имянитов Е.Н., 2010; Razhoomand R. et al., 2013; Olsson H. et al., 2013; Murad N.A.A. et al., 2013].

Таким образом, сохраняется необходимость как в изучении биологических особенностей HER2-позитивных опухолей молочной железы, так и в выборе оптимальных диагностических подходов в оценке статуса онкогена HER-2/neu. Перспективной представляется разработка отечественных тест-систем для оценки уровня экспрессии онкогена HER-2/neu, что является новой наукоемкой и ресурсосберегающей технологией, базирующейся на современных достижениях фундаментальной науки и разработках, соответствующих мировым аналогам.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами

Работа выполнена в рамках темы 04.01 «Разработать метод и технологию производства набора реагентов для молекулярной диагностики уровня экспрессии онкогена c-erbB-2» (№ госрегистрации 19972415, 2004–2006 гг.) Государственной научно-технической программы «Лечебные и диагностические технологии», подпрограмма «Онкология». Исследование соответствует плану научных работ Госу-

дарственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова».

Цель и задачи исследования

Цель исследования — повысить эффективность определения HER2-статуса у пациенток, страдающих раком молочной железы, на основе использования метода количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Для достижения поставленной цели определены следующие задачи:

1. Разработать метод определения уровня экспрессии онкогена HER-2/neu в опухолевой ткани рака молочной железы с использованием количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

2. Определить пороговое значение сверхэкспрессии онкогена HER-2/neu по результатам количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

3. Провести сравнительный анализ тестирования HER2-статуса по уровню экспрессии мРНК онкогена HER-2/neu (полимеразная цепная реакция) относительно выявления амплификации онкогена (флуоресцентная *in situ* гибридизация) и определения экспрессии онкопротеина (иммуногистохимический анализ).

4. Изучить связь между параметрами экспрессии онкогена HER-2/neu, определяемыми методом полимеразной цепной реакции, и клинικο-морфологическими характеристиками опухолевого процесса у пациенток, страдающих раком молочной железы.

Научная новизна

1. Разработан метод определения уровня экспрессии онкогена HER-2/neu в опухолевой ткани РМЖ с использованием количественной ПЦР в режиме реального времени, позволяющий повысить эффективность и рентабельность оценки HER2-статуса для назначения патогенетически обоснованного лечения.

2. Обоснована возможность применения разработанного метода для определения сверхэкспрессии онкогена HER-2/neu у пациенток, страдающих РМЖ.

3. Разработана методология определения порогового значения сверхэкспрессии онкогена HER-2/neu на основе молекулярно-генетического тестирования с использованием в качестве референтных методов технологии FISH и ИГХ-анализа.

4. Показана целесообразность использования метода количественной ПЦР в режиме реального времени для оценки статуса онкогена HER-2/neu при получении неопределенного результата ИГХ-тестирования для выявления HER2-негативных случаев РМЖ.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанный метод определения HER2-статуса на основе количественной ПЦР в режиме реального времени, включающий методику выделения общей фракции РНК из опухолевой ткани с использованием неорганического сорбента, а также протокол амплификации кДНК для количественной оценки уровня экспрессии онкогена HER-2/neu у пациенток, страдающих РМЖ, позволяет с высокой специфичностью (97,3%) выявлять HER2-негативные опухоли.

2. Сравнение результатов тестирования HER2-статуса у пациенток, страдающих РМЖ, с использованием стандартного протокола (ИГХ-анализ с дополнительным FISH-исследованием паттернов, отнесенных к категории score 2+) и количественной ПЦР в режиме реального времени показало высокий процент соответствия данных при отсутствии активации онкогена HER-2/neu (96,5%) и эффективность разработанного метода для выявления HER2-негативных опухолей.

3. Параметры сверхэкспрессии (уровень и частота) онкогена HER-2/neu, выявляемые методом количественной ПЦР в режиме реального времени, не связаны с клинической ситуацией (возраст пациенток, распространенность процесса) и морфологическими характеристиками опухоли (гистологическое строение, степень дифференцировки, гормонально-рецепторный статус).

Личный вклад соискателя учёной степени

Лично автором изучена отечественная и зарубежная литература и выполнен обзор по теме диссертационной работы. Совместно с сотрудниками Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси (ИБОХ НАНБ) кандидатом химических наук А.А. Гилепом и А.С. Бабенко под руководством доктора химических наук, профессора С.А. Усанова проведены: разработка и оптимизация всех методик выделения общей фракции РНК из опухолевой ткани РМЖ, а также метода относительной количественной оценки уровня экспрессии онкогена HER-2/neu с использованием ПЦР в режиме реального времени. По результатам выполненного исследования соискателем предложена методология определения порогового значения сверхэкспрессии маркера, оценена эффективность нового метода для проведения HER2-тестирования. Диссертантом совместно с соавторами подготовлен клинический материал и оформлены печатные работы.

На основании клинического материала автором работы создана компьютерная база данных пациенток, страдающих РМЖ, включенных в данное исследование. Проанализированы клинические и лабораторные данные, проведены статистическая обработка и изложение полученных результатов в виде диссертационной работы. Постановка проблемы, цели, задач исследования и положений, выно-

симых на защиту, обоснование методологии научного исследования и интерпретация полученных данных, формулировка выводов и практических рекомендаций выполнены совместно с научным руководителем доктором медицинских наук, профессором А.А. Машевским и научным консультантом доктором химических наук, профессором, член-корреспондентом НАНБ С.А. Усановым.

Апробация диссертации и информация об использовании её результатов

Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на научных конференциях и съездах: III съезд онкологов и радиологов СНГ (Минск, 2004 г.); научная конференция БГМУ (Минск, 2006 г.); I съезд патологоанатомов Республики Беларусь (Минск, 2006 г.); II Российский симпозиум «Молекулярно-генетическая диагностика злокачественных опухолей человека» (Москва, 2009 г.); научная конференция БГМУ (Минск, 2009 г.); Республиканская научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные вопросы определения эпидермального фактора роста HER-2/neu при раке молочной железы и желудка» (Минск, 2014 г.); Республиканская научно-практическая конференция с международным участием «Современные возможности диагностики и лечения метастатического рака молочной железы» (Минск, 2014 г.).

Автор диссертации участвовал в разработке инструкции по применению: «Определение уровня экспрессии онкогена ERBB2 методом полимеразной цепной реакции у больных раком молочной железы» (регистрационный № 040-0409, 11 июня 2009 г.).

Полученные результаты внедрены для практического применения в лаборатории клинической молекулярной генетики и иммунологических методов диагностики отдела канцерогенеза с морфологической группой РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, в клинической лаборатории стволовых клеток костного мозга Республиканского центра трансплантологии и клеточных биотехнологий УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска, а также в учебный курс преподавания на кафедре онкологии с курсом лучевой диагностики и лучевой терапии медико-диагностического факультета УО «Гродненский государственный медицинский университет».

Соискателем совместно с соавторами разработано и внедрено в практику лаборатории клинической молекулярной генетики и иммунологических методов диагностики отдела канцерогенеза с морфологической группой РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова рационализаторское предложение «Способ определения ERBB2-статуса у больной раком молочной железы» (№ 98, 20 октября 2009 г.).

Опубликование результатов диссертации

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ: 3 статьи в научных журналах и 1 статья в сборнике научных работ, включенных в перечень научных

изданий ВАК Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований, 9 тезисов докладов и публикаций в материалах конференций; утверждена 1 инструкция по применению, получено удостоверение на рационализаторское предложение. Без соавторов опубликованы 2 научные статьи. Объем опубликованных статей составляет 2,2 авторских листа.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 83 страницах машинописного текста и состоит из введения, общей характеристики работы, пяти глав, заключения, библиографического списка, включающего 217 литературных источников и 14 работ автора, 3 приложений. Работа содержит 23 таблицы, 4 формулы, иллюстрирована 27 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы клинического исследования

В основу работы положены данные о 153 пациентках с верифицированным первичным РМЖ, получивших специальное противоопухолевое лечение в онкомаммологическом отделении РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова в период с 2005 г. по 2006 г. Молекулярно-генетические и цитогенетические исследования выполнялись на базе лаборатории клинической молекулярной генетики и иммунологических методов диагностики и патоморфологического отделения.

Характеристика пациенток, клинические и патоморфологические параметры опухолей представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Характеристика пациенток, клинические и патоморфологические параметры опухолей

Критерий	Подгруппы	Пациентки	
		количество	%
Возрастные подгруппы	до 55 лет	88	57,5
	старше 55 лет	65	42,5
Стадия заболевания	I [T1N0M0, N1N1miM0]	17	11,1
	II [T0-1N1M0, T2N0M0, T2N1M0, T3N0M0]	84	54,9
	III [T0-2N2M0, T3N1-2M0, T4N0-2M0, T1-4N3M0]	52	34,0
Поражение лимфатических узлов	N0	63	41,2
	N1	49	32,1
	N2	19	12,4
	N3	22	14,3
Мультицентрический рост	наличие	11	7,2
	отсутствие	142	92,8

Продолжение таблицы 1

Гормонально-рецепторный статус	РЭ+РП+	44	32,6
	РЭ-РП-	54	40,0
	РЭ+РП- и РЭ-РП+	37	27,4
Морфологический вариант опухоли	инфильтрирующая протоковая карцинома	90	58,8
	инфильтрирующая дольковая карцинома	57	37,2
	другие варианты	6	4,0
Степень дифференцировки	низкая (G3)	67	43,8
	средняя (G2)	83	54,2
	высокая (G1)	3	2,0

Для выявления сверхэкспрессии онкогена, гиперэкспрессии онкопротеина и амплификации гена HER-2/neu использованы: метод количественной ПЦР в режиме реального времени, ИГХ-окрашивание и FISH. Указанные исследования проводились параллельно на одном и том же образце опухолевой ткани.

Определение уровня экспрессии онкогена HER-2/neu методом количественной ПЦР в режиме реального времени. Экстракцию общей фракции клеточной РНК из свежзамороженных образцов опухолевой ткани проводили диагностическим набором «Набор реактивов для выделения общей РНК из образцов ткани и клеток с использованием неорганического сорбента РНК-ВТК» (ИБОХ НАН Беларуси). Для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) применен коммерческий набор «Реверта» (ЦНИИ эпидемиологии, РФ). Уровень экспрессии онкогена HER-2/neu определяли диагностическим набором «Набор реактивов для амплификации кДНК гена *cebB2* в режиме реального времени (*cebB2*-ТМ)» (ИБОХ НАН Беларуси) на приборе «Rotor Gene» («Corbet Research», Australia). Реакцию проводили в инкубационной среде объемом 25 мкл, содержащей 50 нг кДНК-матрицы, 0,3 мкМ каждого праймера для амплификации, 0,1 мкМ флуоресцентно-меченого

зонда, 0,2 мМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата (dNTP), 50 мМ KCl, 25 мМ Трис-HCl, 2 мМ MgCl₂ и 1,25 МЕ Taq-полимеразы. ПЦР состояла из первичной денатурации кДНК при 95°С в течение 5 мин и 45 циклов амплификации, проводимых при следующих условиях: 95°С в течение 10 с и 60°С в течение 60 с. Полученные результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения Rotor Gene 6.0.1. Концентрацию искомой кДНК определяли исходя из значения порогового цикла (threshold cycle, Ct), на котором достигается заданный уровень флуоресценции. Для анализа полученных данных ПЦР в режиме реального времени использовали метод калибровочной кривой. За уровень экспрессии онкогена HER-2/neu принимали соотношение концентраций кДНК HER-2/neu и кДНК глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH) — гена внутреннего контроля.

Определение уровня экспрессии онкопротеина HER-2/neu методом ИГХ. ИГХ-окрашивание выполняли на срезах парафиновых блоков опухолевой ткани с использованием первичных поликлональных кроличьих антител и систем визуализации LSAB+/EnVision+ («Dako Denmark A/S», Дания). Оценку результатов проводили с применением светового микроскопа под увеличением ×10, ×20, ×40 по интенсивности окрашивания мембраны и количеству окрашенных клеток согласно общепринятым критериям (score 0, 1+, 2+, 3+).

Определение амплификации онкогена HER-2/neu методом FISH. FISH-исследование выполняли на срезах парафиновых блоков опухолевой ткани с использованием зонда HER2/CEN-17 Probe Mix («Abbott Molecular Inc.», США) на автоматическом гибридайзере («Dako Denmark A/S», Дания). Оценку результатов проводили с использованием флуоресцентного микроскопа «Axioscop» 40 («Zeiss», Германия) при увеличении объектива ×100. Наличие или отсутствие амплификации определяли по соотношению количества красных меток, связанных с геном HER-2/neu, и количества зеленых меток, связанных с центромерным участком 17 хромосомы (CEN-17), в 20 ядрах. Результат считался отрицательным при отношении сигналов ≤1,8, положительным — при >2,2.

Статистические методы, использованные в работе. При обработке полученных результатов использованы методы описательной статистики с определением формы распределения и применением соответствующих критериев проверки статистических гипотез, методы корреляционного анализа, интегральной диагностической информативности моделей методом построения характеристических кривых (ROC-анализ), нелинейного многомерного моделирования взаимосвязей (модель бинарной логистической регрессии).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка метода определения уровня экспрессии онкогена HER-2/neu с использованием количественной ПЦР в режиме реального времени

Выделение общей фракции РНК. В ходе выполненных работ по созданию и оптимизации метода выделения общей фракции клеточной РНК был получен рабочий протокол, основанный на принципе взаимодействия нуклеиновых кислот с неорганическими сорбентами. В серии экспериментов определено оптимальное количество силикагеля, необходимое для проведения исследования, оптимизированы условия сорбции РНК на неорганический носитель, условия промывки связанной РНК и ее элюции с поверхности сорбента. Метод позволяет получить степень очистки препарата РНК, подходящую для последующего проведения ПЦР (1,6–2,1), и концентрацию продукта, достаточную для проведения РНК-электрофореза (не менее 50 нг/мкл). Разработанный метод выделения общей фракции клеточной РНК положен в основу создания диагностического набора «Набор реактивов для выделения общей РНК из образцов ткани и клеток с использованием неорганического сорбента (РНК-ВТК)» (ТУ ВУ 100185129.076-2007).

Выбор гена внутреннего контроля. Для определения оптимального эндогенного контрольного гена исследованы относительные уровни экспрессии в парах HER2/POLR2A (РНК-полимераза 2 типа) (27 образцов) и HER2/GAPDH (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа) (155 образцов) сравнительным Ct методом ($\Delta\Delta Ct$). По совокупности данных ген GAPDH выбран в качестве контроля.

Конструирование специфических олигонуклеотидных праймеров и гибридизационных зондов с флуоресцентной меткой для амплификации кДНК онкогена HER-2/neu и гена внутреннего контроля. В представленном исследовании праймеры и гибридизационные зонды для проведения амплификации конструировались с учетом предъявляемых требований на основании последовательностей кДНК генов с известной структурой с использованием программного обеспечения Win-Star из пакета «Lasergene» (таблица 2).

Таблица 2. – Праймеры и зонды для амплификации генов HER-2/neu и GAPDH

Праймеры и зонды	Характеристики	
	нуклеотидная последовательность	длина участка
HER2_TM_5	5'-CTGAACTGGTGTATGCAGATTGC-3'	23 п.о.
HER2_TM_3	5'-TTCCGAGCGGCCAAGTC-3'	17 п.о.
HER2_FAM-BHQ1	5'-TGTGTACGAGCCGCACATCCTCCA-3'	24 п.о.
GAPDH_5	5'-GAAGGTGAAGGTCCGAGTC-3'	19 п.о.
GAPDH_3	5'-GAAGATGGTGTATGGGATTTC-3'	20 п.о.
GAPDH_R6G-BHQ1	5'-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3'	20 п.о.

Оптимизация условий протекания ПЦР с использованием модифицированных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда. Этапами оптимизации условий протекания ПЦР явились: определение концентраций кДНК-матрицы, олигонуклеотидных праймеров, хлорида магния ($MgCl_2$) с использованием электрофореза в 1% агарозном геле, а также подбор режимов денатурации, отжига и синтеза ДНК. Результатом проведенных исследований явилась разработка рабочего протокола количественного определения уровня экспрессии мРНК онкогена HER-2/neu на основе технологии ПЦР в режиме реального времени. Разработанный метод использован для создания набора реагентов «Набор реактивов для амплификации кДНК гена *cerbB2* в режиме реального времени (*cerbB2-TM*)» (ТУ ВУ 100185129.087-2007).

Определение порогового значения сверхэкспрессии онкогена HER-2/neu для разработанного метода

Обоснованность применения ПЦР для задач определения сверхэкспрессии онкогена HER-2/neu. В представленной работе использован протокол оценки статуса онкогена HER-2/neu по уровню экспрессии его мРНК, основанный на применении количественной ПЦР в режиме реального времени. Методом ПЦР исследовано 153 образца кДНК, выделенных из опухолевой ткани, в 49 случаях проведено тестирование в дублях.

FISH и ИГХ использованы в качестве референтных методов для валидации предложенного протокола и определения порогового значения сверхэкспрессии онкогена. Параллельная оценка HER2-статуса с использованием ИГХ-анализа и количественной ПЦР в режиме реального времени проведена в 145 образцах. FISH-исследование выполнялось при получении неопределенных данных ИГХ (score 2+) либо при несовпадении результатов двух предыдущих тестирований. Копийность гена-мишени с использованием технологии FISH определена в 29 случаях.

Основным референтным методом был выбран FISH, при его отсутствии использованы данные оценки уровня экспрессии онкопротеина HER-2/neu (ИГХ). Данные об активации онкогена HER-2/neu, полученные при тестировании обоими методами, в соответствии с принятыми правилами разделялись на 2 категории: «наличие экспрессии» и «отсутствие экспрессии». Результат такого разделения был назван «отклик». «Отклик» в данном случае равноценен абсолютному знанию о наличии либо отсутствии активации HER-2/neu. Полученные в исследовании значения ПЦР соотносились с определенным таким образом «откликом». Промежуточные результаты FISH и ИГХ при определении порогового значения не учитывались.

Клиническая гипотеза исследования предполагала возможность использования количественной ПЦР в режиме реального времени для определения уровня

экспрессии онкогена HER-2/neu. При этом оценивалась эффективность применения метода на этапе первичного отбора HER2-негативных опухолей. Статистическая гипотеза предполагала наличие связи между значениями ПЦР и «отклика» при определенном пороговом уровне положительных и отрицательных результатов.

С учетом имеющихся данных массив полученных значений ПЦР был разделен на серии, что позволило получить три набора значений (с учетом тестирований, выполненных в дублях). При их обработке изначально оценивалась возможность применения ПЦР в режиме реального времени для разделения результатов наличия либо отсутствия экспрессии онкогена HER-2/neu путем сравнения значений ПЦР в данных подгруппах. Полученные значения $p_{\text{уилкоксона}} < 0,0001$ свидетельствовали о наличии статистически значимых различий уровней экспрессии онкогена HER-2/neu, определенных методом ПЦР, в группах измерений с положительными и отрицательными результатами «отклика». Эти данные явились доказательством возможности применения ПЦР-анализа для количественной оценки уровня экспрессии онкогена HER-2/neu.

Определение точки разделения значений ПЦР в зависимости от абсолютно-го знания о наличии либо отсутствии активации HER-2/neu («отклика»). С целью определения порогового значения сверхэкспрессии онкогена HER-2/neu применен ROC-анализ. За оптимальную точку разделения принимали такое значение количественного признака, которое позволяло с наибольшей специфичностью разбить изучаемую группу на две категории. Именно высокий показатель специфичности метода позволяет использовать его для выявления отсутствия признака, т.е. выделения пациенток с негативным статусом онкогена HER-2/neu.

При обработке трех наборов данных получено три показателя порогового значения отсутствия или наличия сверхэкспрессии онкогена HER-2/neu по результатам количественной ПЦР в режиме реального времени: 0,25, 0,26 и 0,26 соответственно. Для разработанного метода окончательным выбран показатель 0,26, как значение, позволяющее получить минимальное количество ложноотрицательных заключений об отсутствии экспрессии маркера в опухолевой ткани (рисунок 1).

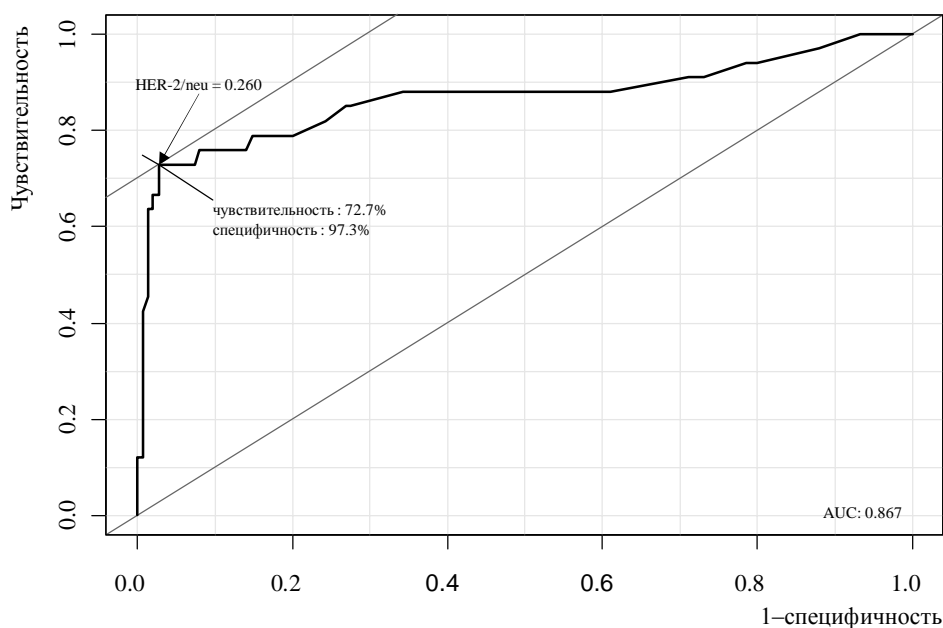


Рисунок 1. – ROC-кривая результатов количественной ПЦР относительно «отклика» для третьего набора значений

При данном пороговом значении диагностический показатель чувствительности составил 72,7% (95% ДИ [64,9; 80,6]), специфичности — 97,3% (95% ДИ [94,7; 98,2]), площадь под ROC-кривой — $0,867 \pm 0,046$. Использование данной точки разделения позволяет минимизировать количество ложноотрицательных результатов при проведении тестирования.

Оценка уровня экспрессии онкогена HER-2/neu методом количественной ПЦР в режиме реального времени в сравнении с FISH и ИГХ

Наличие порогового значения позволило разделить исследуемую когорту на группы со сверхэкспрессией HER-2/neu и отсутствием экспрессии маркера по результатам количественной ПЦР в режиме реального времени. Из 153 пациенток сверхэкспрессия онкогена обнаружена в 24 случаях, что составило 15,7%, в 129 (84,3%) образцах экспрессия отсутствовала. Параллельно тестирование методами ИГХ и ПЦР выполнено в 145 образцах опухолевой ткани, сводные результаты которого представлены в таблице 3.

Таблица 3. – Результаты оценки HER2-статуса методами ПЦР и ИГХ

Результат ПЦР	Результат ИГХ				итого
	score 0	score 1+	score 2+	score 3+	
Сверхэкспрессия	3	2	3	15	23
Отсутствие экспрессии	69	30	15	8	122
Всего	72	32	18	23	145

При сопоставлении результатов оценки HER2-статуса получен высокий процент соответствия данных двух методов в отношении случаев РМЖ, отнесенных к ИГХ-категориям score 0 (97,2%) и score 1+ (93,8%). В группе опухолей, характеризующихся гиперэкспрессией онкопротеина (score 3+), данный показатель составил 65,2% (рисунок 2).

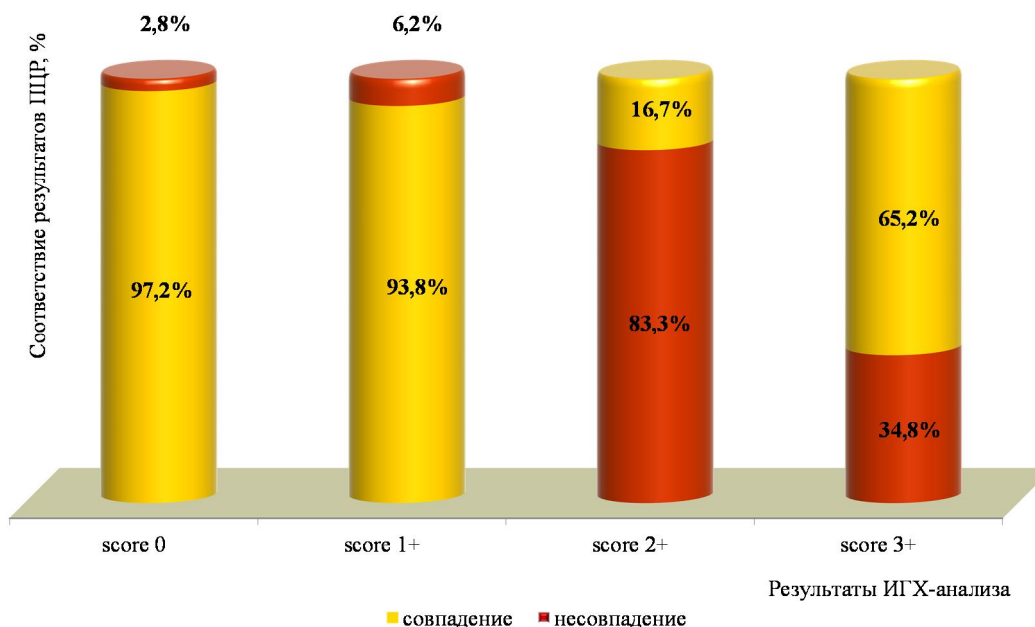


Рисунок 2. – Сопоставление результатов оценки HER2-статуса методами ИГХ и ПЦР

Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности использования метода количественной ПЦР в режиме реального времени для выявления HER2-негативных опухолей, позволяющего минимизировать количество ложно-отрицательных результатов при проведении тестирования.

Сравнительный анализ результатов совместного тестирования методами ИГХ/FISH относительно ПЦР также показал высокий процент соответствия получаемых данных при отсутствии активации онкогена HER-2/neu (96,5%). При наличии амплификации гена-мишени и гиперэкспрессии онкопротеина сверхэкспрессия онкогена, определяемая количественной ПЦР в режиме реального времени, выявлена в 18 из 25 образцов (72%) (рисунок 3).

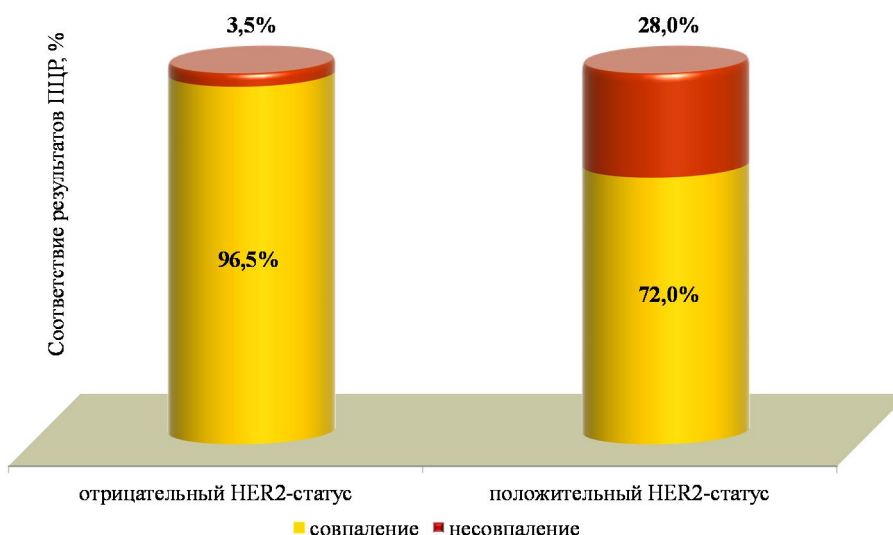


Рисунок 3. – Сопоставление результатов оценки HER2-статуса методами ИГХ/FISH и ПЦР

При сопоставлении данных ПЦР и FISH в группе пациенток, изначально отнесенных к неопределённой ИГХ-категории (score 2+), уровень экспрессии онкогена HER-2/neu по результатам использования ПЦР в режиме реального времени в 69,2% случаев соответствовал данным, полученным при FISH-исследовании (таблица 4).

Таблица 4. – Сопоставление результатов ПЦР и FISH у пациенток, отнесенных к score 2+ (ИГХ)

Количество случаев, абс. (%)	Результат		
	ПЦР	FISH	сопоставление результатов
1 (7,7%)	отсутствие экспрессии	амплификация	несовпадение
3 (23,1%)	отсутствие экспрессии	промежуточный	невозможно оценить
7 (53,8%)	отсутствие экспрессии	отсутствие амплификации	совпадение
2 (15,4%)	сверхэкспрессия	амплификация	совпадение

Представленные данные подтверждают высокую специфичность предлагаемого метода для отбора HER2-негативных случаев РМЖ и показывают целесообразность оценки уровня экспрессии онкогена HER-2/neu для данной категории пациенток перед проведением FISH-тестирования.

Связь клиничко-морфологических характеристик опухолей с параметрами экспрессии онкогена HER-2/neu

В рамках выполненного исследования проведена оценка наличия связи между уровнями экспрессии онкогена HER-2/neu, полученными по результатам тестирования методом количественной ПЦР в режиме реального времени, клинической ситуацией (возраст пациенток, распространенность процесса) и морфоло-

гическими характеристиками опухолей (гистологическое строение, степень дифференцировки, гормонально-рецепторный статус). Также выполнен анализ частоты сверхэкспрессии маркера в данных подгруппах. Сводные данные анализа представлены в таблице 5.

Таблица 5. – Параметры экспрессии онкогена HER-2/neu и клиничко-морфологические характеристики опухоли

Критерий	Подгруппы	Показатель			
		выраженность экспрессии, медиана	p	частота сверхэкспрессии (%)	$p_{\text{Фишера}}$
Возрастные подгруппы	до 55 лет	0,085	$p_{\text{Уилкоксона}}$ 0,6388	15,9	0,7841
	старше 55 лет	0,042		15,4	
Стадия заболевания	I стадия	0,090	$p_{\text{Крускала-Уоллиса}}$ 0,8137	23,5	0,6487
	II стадия	0,070–0,080		14,3	
	III стадия	0,070–0,080		15,4	
Поражение лимфатических узлов	N0	0,100	$p_{\text{Крускала-Уоллиса}}$ 0,0969	20,6	0,2149
	N1	0,060		8,2	
	N2	0,070		10,2	
	N3	0,070		22,7	
Мультицентрический рост	наличие	0,100	$p_{\text{Уилкоксона}}$ 0,1386	36,4	0,0720
	отсутствие	0,070		16,4	
Морфологический вариант опухоли	протоковый	0,080	$p_{\text{Уилкоксона}}$ 1,000	18,9	0,3629
	дольковый	0,071		12,3	
Степень дифференцировки	низкая (G3)	0,080	$p_{\text{Крускала-Уоллиса}}$ 0,8946	14,9	0,8100
	средняя (G2)	0,070		15,7	
	высокая (G1)	0,060		33,3	
Гормонально-рецепторный статус	RЭ+РП+	0,085	$p_{\text{Крускала-Уоллиса}}$ 0,8325	11,4	0,3346
	RЭ–РП–	0,085		20,4	
	RЭ+РП– и RЭ–РП+	0,060		10,8	

В представленном исследовании не установлено статистически значимой связи между уровнем экспрессии онкогена HER-2/neu, полученным по результатам тестирования методом количественной ПЦР в режиме реального времени, и возрастом пациенток ($p_{\text{Уилкоксона}}=0,6388$), страдающих РМЖ, стадией заболевания ($p_{\text{Крускала-Уоллиса}}=0,8137$), степенью поражения регионарных лимфатических узлов ($p_{\text{Уилкоксона}}=0,0969$), гистологической формой опухоли ($p_{\text{Уилкоксона}}=1,0000$), степенью ее дифференцировки ($p_{\text{Крускала-Уоллиса}}=0,8946$), а также статусом РЭ и РП ($p_{\text{Крускала-Уоллиса}}=0,8325$).

Частота экспрессии маркера статистически не различалась в возрастных подгруппах пациенток ($p_{\text{Фишера}}=0,7841$), при различных стадиях заболевания ($p_{\text{Фишера}}=0,6487$), вовлечении регионарного лимфатического коллектора ($p_{\text{Фишера}}=0,2149$),

при различных гистологических вариантах опухолей ($p_{\text{Фишера}}=0,3629$) и степенях дифференцировки ($p_{\text{Фишера}}=0,8100$), а также не зависела от экспрессии РЭ и РП ($p_{\text{Фишера}}=0,3346$).

Отсутствие статистически значимой связи ($p>0,05$) между клинико-морфологическими характеристиками опухолей и параметрами экспрессии онкогена HER-2/neu свидетельствует о возможности использования определенного порогового значения сверхэкспрессии маркера по результатам количественной ПЦР в режиме реального времени у всех пациенток, страдающих РМЖ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Разработан метод оценки статуса онкогена HER-2/neu у пациенток, страдающих раком молочной железы, по уровню экспрессии мРНК, основанный на применении количественной ПЦР в режиме реального времени, включающий методику выделения общей фракции РНК из опухолевой ткани с использованием неорганического сорбента, а также протокол амплификации кДНК онкогена HER-2/neu [2, 6, 8, 11, 12].

2. Определено пороговое значение сверхэкспрессии онкогена HER-2/neu по результатам количественной ПЦР в режиме реального времени, равное 0,26, которое позволяет проводить высокоспецифичное (специфичность 97,3%; 95% ДИ [94,7; 98,2], площадь под ROC-кривой — $0,867\pm 0,046$) выявление HER2-негативных опухолей молочной железы. При данном пороговом значении в исследуемой выборке низкий уровень экспрессии онкогена обнаружен в 84,3% случаев [2, 4, 11, 13].

3. Показана высокая эффективность использования метода количественной ПЦР в режиме реального времени на этапе первичного отбора HER2-негативных опухолей, позволяющая минимизировать количество ложноотрицательных результатов при проведении тестирования. При сравнении данных параллельных исследований соответствие результатов ИГХ и ПЦР, а также результатов совместного использования технологий FISH/ИГХ относительно ПЦР при отсутствии активации онкогена HER-2/neu выявлено в 95,2% и в 96,5% случаев соответственно. При получении неопределенного результата ИГХ-тестирования (score 2+) применение ПЦР в 69,2% позволяет отказаться от последующего выполнения FISH-анализа [1, 2, 3, 4, 7, 8, 13].

4. Параметры экспрессии (уровень, частота) онкогена HER-2/neu, определяемые методом ПЦР в режиме реального времени, не зависят ($p>0,05$) от клинической ситуации (возраст пациенток, распространенность процесса) и морфологических характеристик опухоли (гистологическое строение, степень дифференци-

ровки, гормонально-рецепторный статус), что свидетельствует о возможности использования данной технологии тестирования у всех пациенток, страдающих РМЖ [4, 9, 10].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. При получении неопределенного результата (score 2+) оценки статуса онкопротеина HER-2/neu по данным ИГХ-анализа у пациенток, страдающих РМЖ, перед проведением FISH-исследования рекомендуется использование метода количественной ПЦР в режиме реального времени для выявления HER2-негативных опухолей.

2. Метод количественной ПЦР в режиме реального времени для определения уровня активации онкогена HER-2/neu может использоваться у всех пациенток, страдающих РМЖ, независимо от клинической ситуации и морфологических характеристик опухоли.

3. При определении уровня экспрессии онкогена HER-2/neu методом количественной ПЦР в режиме реального времени рекомендуется использовать «Набор реактивов для выделения общей РНК из образцов ткани и клеток с использованием неорганического сорбента (РНК-ВТК)» и «Набор реактивов для амплификации кДНК гена c-erbB2 в режиме реального времени (cerbB2TM)» согласно инструкций по применению [14].

Список публикаций соискателя учёной степени

Статьи

1. Субоч, Е. И. Онкоген c-ErbB-2 – прогностический и предиктивный молекулярно-биологический фактор у больных раком молочной железы / Е. И. Субоч // Актуальные проблемы онкологии и мед. радиологии : сб. науч. работ / ГУ «НИИ онкологии и мед. радиологии им. Н. Н. Александрова». – Минск, 2006. – С. 107–115.

2. Оценка относительного уровня экспрессии протоонкогена ERBB2 методом ПЦР в режиме реального времени / А. С. Бабенко, Е. И. Субоч, А. А. Гилеп, С. А. Усанов // Вестн. фонда фундам. исслед. – 2009. – № 1. – С. 93–101.

3. Субоч, Е. И. Эффективность оценки уровня экспрессии протоонкогена ERBB2 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени у больных раком молочной железы / Е. И. Субоч // Экол. вестн. – 2009. – № 2. – С. 61–66.

4. Субоч, Е. И. Молекулярное тестирование HER2-статуса методом количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / Е. И. Субоч, А. С. Бабенко // Онколог. журн. – 2014. – Т. 8, № 4. – С. 22–29.

Материалы конференций и тезисы докладов

5. Прогностическое значение некоторых молекулярно-биологических тестов при первичном раке молочной железы / И. В. Залуцкий, Б. Д. Шитиков, С. В. Кошелев, Е. И. Субоч // Аллерголог. и иммунолог. : материалы V съезда иммунологов и аллергологов СНГ, С.-Петербург., 8–11 июля 2003 г. – С.-Петербург., 2003. – Т. 4, № 2. – С. 136.

6. Молекулярная диагностика уровня активации онкогена HER-2/neu / Е. И. Субоч, А. А. Машевский, Б. Д. Шитиков, М. И. Кошелева, С. А. Усанов, А. А. Гилеп // III съезд онкологов и радиологов СНГ : материалы съезда, Минск, 25–28 мая 2004 г. в 2 ч. / ГУ НИИ онкологии и мед. радиологии им. Н. Н. Александрова. – Минск : ОДО «Тонпик», 2004. – Ч. 1. – С. 291.

7. Иммуногистохимическая оценка HER-2/neu статуса у больных раком молочной железы и его значение в клинической практике / А. Ч. Дубровский, Е. И. Субоч, Н. Н. Антоненкова, Р. М. Смолякова // Высокие технологии в морфологии, их значение в клинике и перспективы внедрения в практическое здравоохранение : материалы I съезда патологоанатомов Респ. Беларусь, Минск, 12–13 июня 2006 г. / РУМЦ ФВН ; редкол.: М. К. Недзьведь [и др.]. – Минск, 2006. – С. 14–16.

8. Молекулярная диагностика уровня экспрессии онкогена c-erbB-2 с использованием полимеразной цепной реакции в формате реального времени у больных раком молочной железы / Р. М. Смолякова, Е. И. Субоч, Б. Д. Шитиков, А. А. Машевский, С. А. Усанов, А. А. Гилеп, Т. М. Кудина // Достижения мед. науки Беларуси : рецензируемый науч.-практ. ежегодник. – Минск : ГУ РНМБ, 2006. – Вып. XI. – С. 74–75.

9. Молекулярно-биологические критерии прогноза у больных раком молочной железы / Р. М. Смолякова, М. П. Будько, А. С. Портянко, О. Н. Касьяненко, А. Ч. Дубровский, Т. М. Кудина, Е. И. Субоч // Клиническая лабораторная диагностика в XXI веке : сб. материалов VII съезда специалистов клинической лабораторной диагностики Респ. Беларусь, Минск, 25–26 окт. 2007 г. / МЗ Респ. Беларусь ; редкол.: В. И. Жарко [и др.]. – Минск, 2007. – С. 294–297.

10. Иммунофенотипические критерии прогноза у больных раком молочной железы / А. Ч. Дубровский, Р. М. Смолякова, М. П. Будько, Е. И. Субоч,

Л. Г. Земко, С. В. Бузюк, Т. М. Кудина, Т. Л. Найденова // V съезд онкологов и радиологов СНГ : материалы съезда, Ташкент, 14–16 мая 2008 г. / РОНЦ МЗ Респ. Узбекистан. – Ташкент, 2008. – С. 93.

11. Оценка уровня экспрессии протоонкогена ERBB2 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени у больных раком молочной железы / Е. И. Субоч, А. А. Машевский, А. С. Бабенко, С. А. Усанов // Молекулярно-генетическая диагностика злокачественных опухолей человека : тез. докл. II Российского симпозиума, Москва, 22–23 янв. 2009 г. / ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – М., 2009. – С. 28–29.

12. Бабенко, А. Молекулярная диагностика рака молочной железы // А. Бабенко, Е. Субоч, С. Усанов // Наука и инновации. – 2011. – № 1. – С. 18–19.

13. Субоч, Е. И. Комплексная молекулярно-генетическая оценка ERBB2-статуса при раке молочной железы / Е. И. Субоч // Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине : тез. докл. III международной научно-практической конференции, Казань, 22–24 нояб. 2012 г. / Казанский (Приволжский) федеральный университет. – Казань, 2012. – С. 358–359.

Инструкции по применению

14. Определение уровня экспрессии онкогена ERBB2 методом полимеразной цепной реакции у больных раком молочной железы : инструкция по применению № 040-0409 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 11.06.2009 г. / сост. А. А. Машевский, Е. И. Субоч, С. А. Усанов, А. А. Гилеп, А. С. Бабенко. – Минск : РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, 2009. – 11 с.

РЭЗІУМЭ

Субач Алена Іванаўна

Палімеразная ланцуговая рэакцыя як метада вызначэння ўзроўню экспрэсіі анкагена HER-2/neu ў хворых на рак малочнай залозы

Ключавыя словы: рак малочнай залозы (PM3), анкаген HER-2/neu, палімеразная ланцуговая рэакцыя (ПЛР), парогавы ўзровень звышэкспрэсіі.

Мэта даследавання: павысіць эфектыўнасць вызначэння HER2-статусу ў хворых на рак малочнай залозы на аснове выкарыстання метада палімеразнай ланцуговой рэакцыі ў рэжыме рэальнага часу.

Метады даследавання: у аснову работы пакладзены дадзеныя аб 153 хворых з падцверджаным дыягназам РМЗ I–III стадый, якія знаходзіліся на абследаванні і лячэнні ў анкамамалагічным аддзяленні РНПЦ АМР ім. М.М. Аляксандрава ў перыяд з 2005 г. па 2006 г. Для выяўлення звышэкспрэсіі анкагена, звышэкспрэсіі анкапратэіна і ампліфікацыі анкагена HER-2/neu выкарыстаны: метады колькаснай ПЛР ў рэжыме рэальнага часу, ІГХ-акрашванне і FISH-даследаванне адпаведна.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: распрацаваны новы метады ацэнкі статусу анкагена HER-2/neu у хворых на РМЗ, заснаваны на выкарыстанні колькаснай ПЛР ў рэжыме рэальнага часу, характарызуецца тэхнічнай прастатой выканання, адсутнасцю суб'ектывізму пры правядзенні аналізу атрыманых дадзеных і рэнтабельнасцю ў параўнанні са стандартнымі тэхналогіямі тэставання. Вызначанае парогавое значэнне звышэкспрэсіі анкагена HER-2/neu, роўнае 0,26, дазваляе праводзіць высокаспецыфічнае (спецыфічнасць 97,3%; 95% ДІ [94,7; 98,2], плошча пад ROC-крывой — $0,867 \pm 0,046$) выяўленне HER2-негатывных пухлін малочнай залозы. Паказаная высокая эфектыўнасць выкарыстання метада ПЛР для адбору HER2-негатывных пухлін пры атрыманні нявызначанага выніку ІГХ-тэставання (score 2+) у 69,2% дазваляе адмовіцца ад наступнага выканання FISH-аналізу. Усталяваная адсутнасць статыстычна значнай сувязі ($p > 0,05$) паміж параметрамі (узровень, частата) звышэкспрэсіі анкагена HER-2/neu і клінічнай сітуацыяй (узрост пацыентак, распаўсюджанасць працэсу), а таксама марфалагічнымі характарыстыкамі пухліны (гісталагічная форма, ступень дыферэнцыявання, гарманальна-рэцэптарны статус) сведчыць аб магчымасці выкарыстання дадзенай тэхналогіі тэставання ва ўсіх хворых на РМЗ.

Ступень выкарыстання: матэрыялы дысертацыйнай працы выкарыстоўваюцца ў РНПЦ АМР ім. М.М. Аляксандрава.

Галіна прымянення: анкалогія, малекулярная біялогія.

РЕЗЮМЕ

Субоч Елена Ивановна

Полимеразная цепная реакция как метод определения уровня экспрессии онкогена HER-2/neu у пациенток, страдающих раком молочной железы

Ключевые слова: рак молочной железы (РМЖ), онкоген HER-2/neu, полимеразная цепная реакция (ПЦР), пороговое значение сверхэкспрессии.

Цель исследования: повысить эффективность определения HER2-статуса у пациенток, страдающих раком молочной железы, на основе использования метода количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Методы исследования: в основу работы положены данные о 153 пациентках с верифицированным первичным РМЖ I–III стадий, находившихся на обследовании и лечении в онкомаммологическом отделении РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова в период с 2005 г. по 2006 г. Для выявления сверхэкспрессии онкогена, гиперэкспрессии онкопротеина и амплификации онкогена HER-2/neu использованы: метод количественной ПЦР в режиме реального времени, ИГХ-окрашивание и FISH-исследование соответственно.

Полученные результаты и их новизна: разработанный новый метод оценки статуса онкогена HER-2/neu у пациенток, страдающих РМЖ, основанный на применении количественной ПЦР в режиме реального времени, характеризуется технической простотой исполнения, отсутствием субъективизма при оценке получаемых данных и рентабельностью в сравнении со стандартными технологиями тестирования. Определенное пороговое значение сверхэкспрессии онкогена HER-2/neu, равное 0,26, позволяет проводить высокоспецифичное (специфичность 97,3%; 95% ДИ [94,7; 98,2], площадь под ROC-кривой — $0,867 \pm 0,046$) выявление HER2-негативных опухолей молочной железы. Показанная высокая эффективность использования метода ПЦР для отбора HER2-негативных опухолей при получении неопределенного результата ИГХ-тестирования (score 2+) в 69,2% позволяет отказаться от последующего выполнения FISH-анализа. Установленное отсутствие статистически значимой связи ($p > 0,05$) между параметрами (уровень, частота) сверхэкспрессии онкогена HER-2/neu и клинической ситуацией (возраст пациенток, распространенность процесса), а также морфологическими характеристиками опухоли (гистологическое строение, степень дифференцировки, гормонально-рецепторный статус) свидетельствует о возможности использования данной технологии тестирования у всех пациенток, страдающих РМЖ.

Степень использования: материалы диссертационной работы используются в РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова.

Область применения: онкология, молекулярная биология.

SUMMARY

Suboch Elena Ivanovna

Polymerase chain reaction as a method to detect the level of HER-2/neu oncogene expression in breast cancer patients

Key words: breast cancer, oncogene HER-2/neu, polymerase chain reaction (PCR), threshold value of overexpression.

Research objective: to increase HER2-status detection efficiency in breast cancer patients using a method of quantitative real-time polymerase chain reaction.

Research technique: the research is based on 153 patients with verified primary breast cancer (I-III stages). The patients were examined and treated in oncomammology department in N.N. Alexandrov National Cancer Centre since 2005-2006. The method of quantitative real-time PCR, IHC staining and FISH analysis were respectively used to detect the oncogene overexpression, oncoprotein overexpression and oncogene amplification HER-2/neu.

The results and their novelty: in comparison with standard testing technologies, new developed technique of assessing the oncogene HER-2/neu status in breast cancer patients using the method of quantitative real-time PCR, is characterized by technical ease of use, absence of subjectivism while assessing the received data, profitability. Certain threshold value of HER-2/neu oncogene overexpression, which is 0.26, allows to carry out highly specific (specificity 97.3%; 95% CI [94.7; 98.2], the area under the ROC-curve — 0.867 ± 0.046) detection of HER2-negative breast cancer tumor. We have demonstrated high efficacy of the PCR technique for selecting HER2-neu negative tumors in case of an uncertain IGH testing (score 2+) 69.2% result, eliminating the need for subsequent FISH-analysis. The established absence of statistically significant relations ($p > 0.05$) between the parameters (level, rate) of oncogene HER-2/neu overexpression and clinical situation (patient age, extend of disease), as well as pathological features of the tumor (histological structure, differentiation grade, hormone receptor status) demonstrate that it's possible to use this testing technology in all patients, suffering from breast cancer.

Extent of use: the materials of the dissertation are being used in N.N. Alexandrov National Cancer Centre.

Field of application: oncology, molecular biology.