

Возможности технологии секвенирования «нового поколения» (NGS) для анализа биологических образцов с низким содержанием мутантной ДНК

Е.Н. Тельшева, Н.Н. Новицкая, Г.П. Снигирева

ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии»
Минздрава России, Москва

Введение. Свободно циркулирующая ДНК (сцДНК) плазмы крови все чаще используется в качестве малоинвазивного метода диагностики, мониторинга и прогноза течения заболевания у пациентов с различными формами рака. Такие исследования в отличие от биопсии менее травматичны и гораздо лучше подходят для оценки состояния пациента в динамике, сохраняя при этом достаточно высокую информативность. В последнее время для анализа сцДНК используется секвенирование «нового поколения» (NGS), которое позволяет точно определить клинически значимые мутации даже при малом количестве исходного материала.

Задачи исследования. Оценить возможности метода NGS для определения клинически значимых мутаций в сцДНК плазмы крови у онкологических больных.

Материалы и методы. Проанализированы образцы сцДНК, собранные до операции и на 5-й день после хирургического лечения у 20 пациентов с диагнозом колоректального рака, у которых были выявлены мутации в генах *KRAS* и *BRAF* в тканях первичной опухоли. Поиск мутаций в образцах проводили методом NGS на 2 платформах: секвенатор MiSeq фирмы Illumina, набор для подготовки библиотек GeneRead DNASeq Targeted Panel v2 Human Colorectal Cancer (Qiagen, США); секвенатор Ion Torrent PGM, набор для подготовки библиотек Ion Ampliseq Cancer HotSpot Panel (Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты. При исследовании образцов сцДНК плазмы крови только в 60 % случаев были подтверждены мутации в генах *KRAS* и *BRAF*, обнаруженные ранее в ткани первичной опухоли. В оставшихся образцах мутации не выявлены.

Выводы. Остается актуальным обсуждение возможных причин, которые могут оказывать влияние на расхождения результатов при исследовании ДНК первичной опухоли и сцДНК плазмы крови, включая стадию заболевания и особенности его течения, а также методические аспекты, касающиеся выделения ДНК из плазмы крови и особенностей подготовки библиотек.

Корреляционная зависимость экспрессии белка BRCA1, маркера репарации ДНК и рецепторов стероидных гормонов, маркеров пролиферации в ткани рака молочной железы

Е.А. Шестакова, Е.А. Дудко, А.Н. Гришанина, И.Г. Воробьева,
Н.О. Вихлянцева, С.Д. Коломийцев, Т.А. Богущ

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Супрессор опухолей BRCA1 участвует в репарации повреждений ДНК. Нарушение функции BRCA1 приводит к развитию ряда онкологических заболеваний, при этом BRCA1-ассоциированный рак развивается в основном в эстрогензависимых тканях организма.

Задачи исследования. В целях клинической оценки экспериментальных данных о взаиморегуляции экспрессии BRCA1 и эстрогеновых рецепторов (ЭР) α проведен сравнительный анализ экспрессии BRCA1, ЭР α и других стероидных рецепторов в ткани рака молочной железы (РМЖ). Для выявления прогностической значимости экспрессии BRCA1 проведена сравнительная оценка уровня маркера в ткани РМЖ в группах с благоприятным и неблагоприятным прогнозом по статусу ЭР α .

Материалы и методы. Количественная оценка экспрессии BRCA1, ЭР α , ЭР β и прогестероновых рецепторов (ПР) проведена в 50 хирургических образцах РМЖ с использованием иммунофлуоресцентного анализа, ассоциированного с проточной цитофлуориметрией. В работе использованы первичные антитела к BRCA1 (SD118, Calbiochem), ЭР β (14C8, Abcam), ПР (M3569, DAKO), ЭР α (SP-1, Abcam) и вторичные — DyLight650 (ab98729) и DyLight650 (ab98510). Уровень экспрессии маркеров анализировали с помощью программы FlowJo 10.0 и статистического метода Колмогорова—Смирнова.

Результаты. Продемонстрирована прямая умеренная и достоверная корреляционная связь уровня экспрессии BRCA1 и ЭР α (критерий Спирмена, $r = 0,44$; $p = 0,001$), сопровождавшаяся прямой умеренной и достоверной корреляцией экспрессии ЭР α и ЭР β ($r = 0,28$; $p = 0,05$) в ткани РМЖ.

Найдена прямая умеренная и достоверная корреляционная связь уровня экспрессии BRCA1 и ПР ($r = 0,41$; $p = 0,02$).

Не обнаружено достоверной корреляционной связи экспрессии BRCA1 и ЭР β .

Выявлена корреляция сниженного уровня экспрессии BRCA1 с отрицательным статусом ЭР α в опухоли: в 80 % случаев уровень экспрессии BRCA1 в ЭР α -отрицательных опухолях был ниже медианы уровня экспрессии BRCA1 по всей группе включенных в исследование больных.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о прямой корреляционной связи экспрессии BRCA1 с ЭР α и ПР, а также ЭР α с ЭР β , что проливает свет на возможные причины тканевой специфичности BRCA1-ассоциированных опухолей.

Повышение частоты случаев сниженного уровня BRCA1 в прогностически неблагоприятной группе пациенток с ЭР α -отрицательным РМЖ свидетельствует в пользу возможной прогностически неблагоприятной значимости пониженного уровня экспрессии BRCA1 в опухолевой ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 15-04-06991_а, № 16-34-01049_мол_а) и гранта Президента РФ № МК-7709.2016.7.

Анализ динамики экспрессии генов *HER2-neu* и *BIRC5* в циркулирующих опухолевых клетках при раке молочной железы на фоне терапии трастузумабом

Е.А. Шляхтунов

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Витебск

Введение. Доказанная эффективная анти-HER2-терапия трастузумабом является оптимальным методом лечения больных раком молочной железы (РМЖ) с гиперэкспрессией HER2-neu. Однако к настоящему времени эффективность терапии в динамике определить сложно. Экспрессия сурвивина (BIRC5) может служить индикатором агрессивности опухолевого процесса.

Задачи исследования. Выявление корреляции между эффективностью терапии трастузумабом и экспрессией генов *HER2-neu* и *BIRC5* в циркулирующих опухолевых клетках (ЦОК) при РМЖ.

Материалы и методы. В исследование включено 46 пациенток. Во всех 46 случаях имела место подтвержденная иммуногистохимическим (ИГХ) или FISH-методом гиперэкспрессия HER2-neu. Также определена экспрессия генов *HER2-neu* и *BIRC5* в нативной опухолевой ткани методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Кроме того, в каждом случае проводили выделение ЦОК из образцов периферической крови и определение экспрессии вышеназванных генов. Всем женщинам проводили системную терапию трастузумабом в соответствующем режиме. Эффективность терапии оценивали путем экспрессии генов *HER2-neu* и *BIRC5* в ЦОК, выделенных из периферической крови пациенток.

Результаты. В первичной карциноме молочной железы определялась высокая экспрессия гена *HER2-neu* во всех 46 образцах. Экспрессия гена *BIRC5* определялась в 26 (57 %) образцах. В ЦОК в 34 (74 %) слу-

чаях определялась высокая экспрессия гена *HER2-neu* со средним значением $1,40 \pm 0,49$. У 30 (65 %) женщин в ЦОК определялась экспрессия гена *BIRC5* со средним значением $0,90 \pm 0,19$.

Уже через 1 мес от начала терапии трастузумабом в адъювантном режиме у пациенток отмечали динамическое снижение экспрессии гена *HER2-neu* в ЦОК. Достоверное снижение уровня экспрессии рецептора эпидермального фактора роста в ЦОК наблюдалось у 18 пациенток, что составило 53 % из числа тех, у кого имела место гиперэкспрессия *HER2-neu* в ЦОК, и 39 % от числа всех женщин с гиперэкспрессией *Her2-neu* в первичной опухолевой ткани по данным ИГХ-/FISH-анализа.

Наибольшее снижение экспрессии гена *BIRC5* в ЦОК наблюдалось при применении комплексной терапии РМЖ – трастузумаба и полихимиотерапии. Однако следует отметить, что у 16 пациенток (53 % от числа тех, у кого была экспрессия *BIRC5*, и 35 % от числа всех пациенток) на фоне терапии всегда определялась экспрессия гена сурвивина. У 14 пациенток (47 % от числа пациенток с экспрессией *BIRC5*) экспрессия антиапоптотического гена не определялась.

Выводы. Исследование доказывает эффективность методики контроля таргетной терапии трастузумабом путем оценки экспрессии генов *HER2-neu* и *BIRC5* в ЦОК.

Дизайн таргетной панели для диагностики рака щитовидной железы методом высокопроизводительного секвенирования

В.Д. Якушина, Л.В. Лернер, А.В. Лавров

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва; ООО «ПреМед», Научно-клинический центр «ПреМед – Европейские технологии», Москва

Введение. Существующий в настоящее время подход к диагностике рака щитовидной железы, основанный на цитологическом исследовании, обладает недостаточно высокой точностью и в 20–30 % случаев не позволяет установить доброкачественный или злокачественный характер узловых изменений щитовидной железы.

Задачи исследования. Дизайн таргетной панели для диагностики рака щитовидной железы по материалу тонкоигольной аспирационной биопсии методом высокопроизводительного секвенирования.

Результаты. Список диагностически значимых мутаций был сформирован по результатам анализа данных литературы и базы данных COSMIC. Для включения в панель были отобраны 456 соматических мутаций (в 25 генах), 3 мутации типа CNV (SCNA-22q-del, 9q21.3-q32 del, 1q gain), 23 геновые перестройки.