

каспаза-8; 2) каспаза-3 является универсальной эффекторной каспазой как «внутреннего», так и «внешнего» пути; 3) каспаза-6 является одним из наименее изученных представителей данного семейства эндопептидаз и спектр ее протеолитических мишеней не перекрывается со спектром других эффекторных каспаз [Pennagum B., et al. 2010]. При анализе развития РШМ (с ЦИН 3) выявлено увеличение количества клеток, экспрессирующих на поверхности мембраны CD95-маркер ($p < 0,01$), что послужило основанием для установления связи уровня экспрессии каспаз, ассоциированных с CD95-зависимым проведением сигнала на уровне мРНК и протеолитической активности. Исследованы уровни протеолитической активности рецептор-регулируемой каспазы -8, эффекторных каспаз -3 и -6, и каспазы-9 в ЛПК у больных с ЦИН 3, РШМ и группы контроля. Для каспазы-8 отмечено достоверное увеличение протеолитической активности в ЛПК ($p < 0,01$), но при ЦИН 3 в 53% случаев уровень активности каспазы-8 не отличался от контроля. Схожая закономерность наблюдалась для каспазы-6 ($p < 0,01$). Для каспазы-3 при развитии от ЦИН 3 к РШМ IA стадии активность повышалась, далее при РШМ II–IV стадий постепенно снижалась до контрольных значений. Напротив, активность каспазы-9 при прогрессии РШМ снижалась относительно группы контроля ($p < 0,01$). Также была проведена оценка формирования апоптоз-резистентного фенотипа в ткани шейки матки путем определения экспрессии каспаз -3, -6 и -9 на уровне мРНК и протеолитической активности. При ЦИН 3 в 38% случаев отмечено увеличение активности эффекторных каспаз -3 и -6 и в 14% увеличение активности каспазы-9 по сравнению с контролем, что подтверждает активацию маркеров апоптоза в клинических образцах ЦИН 3. Затем при развитии РШМ наблюдается снижение активности всех исследуемых каспаз, напротив уровень мРНК каспаз -3, -6, -9 не изменялся или увеличивался в образцах карциномы по сравнению с контролем.

Выводы

Заключение. Показано, что каспазы занимают одну из ключевых позиций в развитии рака шейки матки. Разделение функциональных активностей каспаз в моноклеарных клетках и опухолевой ткани предполагает возможное использование этой группы ферментов в качестве дополнительных предикторных маркеров при РШМ.

НЕСБАЛАНСИРОВАННЫЕ ХРОМОСОМНЫЕ АНОМАЛИИ В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

1, 2 Литвяков Н.В., 1 Казанцева П.В.,
1, 2 Цыганов М.М., 1 Ибрагимова М.К.,
1 Слонимская Е.М., 1, 2 Чердынцева Н.В.

1 Томский НИИ онкологии, г. Томск, Россия
2 Национальный исследовательский Томский
государственный университет, г. Томск, Россия

Актуальность

В опухоли молочной железы несбалансированные хромосомные аномалии представлены, в основном, делециями и амплификациями. Был проведен полногеномный микроматричный анализ связи эффективности неоадъювантной химиотерапии (НАХТ) с частотой и локализацией делеций и амплификацией в опухоли молочной железы.

Материалы и методы

В исследование были включены 68 больных раком молочной железы, находившихся на лечении в клиниках Томском НИИ онкологии с 2006–2010 годы. Всем больным проводили НАХТ по схемам FAC, SAH или монотерапия таксотером. Эффективность НАХТ оценивали по критериям ВОЗ. ДНК выделяли из 68 биопсийных образцов опухолевой ткани до лечения, РНК выделяли из 68 парных образцов до лечения и операционных образцов после НАХТ. Микроматричный анализ проводили на ДНК-чипах высокой плотности фирмы Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array, которые содержат 2 млн 670 тыс. маркеров. Дополнительно оценивали экспрессию ABC-транспортёров и генов монорезистентности: ABCB1, ABCB3, ABCC1, ABCC2, ABCC5, ABCG1, ABCG2, MVP, TOP2a, TUBB3, TYMS оценивали в парных образцах опухоли молочной железы при помощи qPCR.

Результаты

Частота цитобэндов с делециями и амплификациями в опухоли связана с эффектом НАХТ. У пациентов с низкой частотой aberrантных цитобэндов (менее 7%) в 9 из 11 случаев отсутствует ответ на НАХТ. У 75% (21/28) пациентов с высокой частотой аномальных цитобэндов (более 35%) отмечается хороший ответ на НАХТ.

Локализация хромосомных аномалий также связана с эффектом НАХТ. У 80% (36/45) боль-

ных с амплификацией или делецией в опухоли локуса 1q43, наблюдается частичная регрессия, тогда как у 78% (18/23) больных с нормальным состоянием этого локуса отсутствует ответ на НАХТ ($p = 0.000005$ по критерию Фишера). У 82% (28/34) больных с делецией или амплификацией локусов 11q22.1 – 23.3 отмечается ответ на НАХТ, а 62% (21/34) больных с нормальным состоянием региона не отвечали на лечение ($p = 0.0004$). При делеции хотя бы одного из локусов генов ABC-транспортеров (ABCB5-3q27, ABCG2-4q22.1, ABCB3-6p21.32, ABCB1-7q21.1, ABCC1-16p11.2, MVP-16p13.1) не формируется фенотип множественной лекарственной устойчивости (экспрессия генов в опухоли после НАХТ снижена) и отмечается 85–100% эффективность НАХТ.

При делеции локуса гена TOP2A-17q21.2 наблюдается низкая экспрессия гена и ответ на антрациклины (FAC и CAH) у 64% (9/14) больных. При делеции локуса гена TUBB3-16q24.3 снижена экспрессия гена и 6 из 9 (67%) пациентов отвечали на таксотер, при нормальном состоянии локуса только 2 из 5 (40%) пациентов отвечали на таксотер. Делеция локуса гена BRCA1-17q21.31 в опухоли молочной железы, в отличие от герминальной мутации, довольно распространенное явление и отмечается у 37% (25/68) больных, амплификация была у 9/68 (13%) пациентов. Больные с делецией локуса гена BRCA1 в опухоли, хорошо отвечали на FAC и CAH (75% – 15/20 случаев), при амплификации только 44% (4/9) отвечали на данные схемы НАХТ. 3 из 4 пациентов с делецией BRCA1 не ответили на таксотер, у ответившего пациента уменьшения опухоли составило 56%. Можно полагать, что наличие делеции гена BRCA1 в опухоли является противопоказанием для назначения таксанов в неоадьюванте. Делеция локуса гена TYMS-18p11.32 в 100% (7/7) случаев была сопряжена с ответом на кселоду (CAH) и в 88% (7/8) на фторурацил (FAC), в то время как при нормальном или амплифицированном состоянии локуса TYMS ответ на кселоду отмечался только в 31% (4/13) случаев, а на фторурацил в 56% (14/25) случаев.

Выводы

На основе несбалансированных хромосомных аномалий в опухоли молочной железы были идентифицированы потенциальные маркеры, оценка которых до лечения позволит прогнозировать ожидаемую эффективность НАХТ и определять целесообразность ее проведения, а также осуществлять персонализированный подбор химиопрепаратов.

РАЗРАБОТКА ТЕСТА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ КРУПНЫХ ПЕРЕСТРОЕК BRCA1 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ КАПЕЛЬНОЙ (DROPLET) ПЦР

Преображенская Е.В., Соколенко А.П.

ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия

Актуальность

В гене BRCA1, помимо микромутаций, встречаются дупликации или делеции одного/нескольких экзонов. В России аномалии копийности экзонов BRCA1 ответственны за 2% случаев наследственного рака молочной железы (PMЖ), что делает необходимым включение такого теста в рутинную диагностическую панель.

Материалы и методы

Для молекулярной диагностики подобных повреждений используется метод MLPA, но его применение ограничено необходимостью приобретать коммерческие наборы одного производителя. Кроме того, протокол анализа предполагает работу с амплификатом, что увеличивает риск контаминации. Нам представляется целесообразным разработать более простой, не требующий дополнительных манипуляций с продуктами ПЦР, но не менее чувствительный тест для выявления дупликаций/делеций экзонов гена BRCA1. Мы приняли попытку использовать для детекции указанных повреждений метод капельной (droplet) ПЦР. Разработка метода заключалась в подборе олигонуклеотидных флуоресцентных зондов для целевых участков гена BRCA1 и фрагменту гена-рефери (RPPH1) и оптимизации количества матрицы. После отработки теста на контрольных образцах (содержащих делеции экзонов и без мутаций), мы апробировали метод на экспериментальной группе 35 больных PMЖ с признаками наследственной формы, негативных в отношении микромутаций в гене BRCA1.

Результаты

Первый этап разработки теста был направлен на определение копийности 2, 3, 5 и 8 экзонов гена BRCA1. Ранее методом MLPA нами были выявлены случаи делеций экзонов 1–2 и 3–7 [Iyevleva et al., 2010]. Указанные образцы послужили контролем для оптимизации нового теста. К фрагментам экзонов 2, 3, 5 и 8 BRCA1