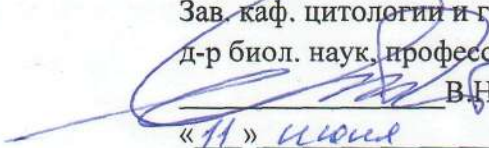


Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
Институт биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства
Кафедра цитологии и генетики

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК

Руководитель ООП
Зав. каф. цитологии и генетики,
д-р биол. наук, профессор
 В.Н. Стегний
« 11 » июня 2019 г.

Певзнер Алина Михайловна

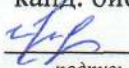
СОМАТИЧЕСКИЙ СТАТУС ГЕНА BRCA1 В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ:
ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХИМИОТЕРАПИИ И ИСХОДА ЗАБОЛЕВАНИЯ

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

На соискание степени магистра биологии

направление подготовки

06.04.01 – Биология

Руководитель ВКР
канд. биол. наук, с.н.с
 М. М. Цыганов
подпись
« 11 » июня 2019 г.

Автор работы
студент группы № 01321
 А. М. Певзнер
подпись

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	6
1.1 Рак молочной железы	6
1.2 Неоадьювантная химиотерапия	8
1.3 Ген BRCA1	10
1.4 Гомологичная рекомбинация двунитевых разрывов ДНК	13
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	17
2.1 Материалы	17
2.1.1 Объект исследования	17
2.1.2 Материал исследования	19
2.2. Методы исследования	19
2.2.1 Выделение РНК	19
2.2.2 Выделение ДНК	20
2.2.3 Капиллярный электрофорез	21
2.2.4 Количественная ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени	22
2.2.5 Анализ метилирования промотора гена <i>BRCA1</i>	22
2.2.6 Микроматричный анализ	23
2.2.6 Цифровая ПЦР	25
2.2.6 Статистические методы	26
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	27
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	45

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АХТ – адъювантная химиотерапия

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГР – гомологичная рекомбинация

НХТ - неадъювантная химиотерапия

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РМЖ – рак молочной железы

ER – рецепторы эстрогенов (estrogen receptor)

PR – рецепторы прогестерона (progesterone receptor)

HER-2 – рецептор эпидермального фактора роста (human epidermal growth factor receptor 2)

HRD – дефицит гомологичной рекомбинации (Homologous recombination deficiency)

CNA – количество копий аббераций (Copy number aberrations)

SNP – однонуклеотидный полиморфизм (Single nucleotide polymorphism)

ВВЕДЕНИЕ

Ген *BRCA1* расположен на длинном плече 17 хромосомы (17q21.31; 24 экзона; 81 189 пн; 1863 а.к.) и кодирует ядерный фосфобелок, который участвует в репарации ДНК в клетке и в регуляции клеточного цикла (PubMed; OMIM 113705).

Помимо контроля повреждений ДНК и поддержания целостности генома *BRCA1* выполняет и ряд других функций. Он связывает рецептор эстрогенов и репрессирует его транскрипционную функцию, сдерживая, таким образом, избыточную пролиферацию клеток молочной железы и других эстроген-зависимых органов (Markowska J., 2013). В этой связи исследование гена *BRCA1* становится актуальным не только при триждынегативном, но и при гормон-чувствительном (в частности люминальном В) раке молочной железы. В клетках с дефектным *BRCA1*, за счет снижения активности репарации ДНК, наблюдается сильная генетическая нестабильность, повышается частота возникновения спонтанных или индуцированных мутагенами генетических изменений - генных мутаций, хромосомных транслокаций, анеуплоидии и т.д. (Rebbeck T. R., 2015).

Впервые герминальная мутация *BRCA1* 5382insC в 20-м экзоне была выявлена в 1994 году, и показана ее сопряженность с высоким риском развития наследственного рака молочной железы и яичников (Simard J., 1994). Лишь спустя 15 лет после открытия герминальной мутации гена *BRCA1* 5382insC было обнаружено, что пациенты, имеющие данную мутацию, обладают высокой чувствительностью к препаратам платины (Byrski T., 2009; Byrski T., 2014). В другом исследовании на раке яичников было установлено, что применение химиотерапии на основе платины у больных с герминальной мутацией *BRCA1* значительно эффективнее по сравнению с группой больных без данного нарушения в гене. Кроме этого, предполагается, что *BRCA1*-ассоциированный РМЖ характеризуются резистентностью к «золотому стандарту» терапии РМЖ – препаратам из группы таксанов.

Большинство современных исследований ограничены изучением лишь герминальных мутаций и очень мало работ, которые характеризуют различные соматические изменения гена *BRCA1* в опухоли, такие как однонуклеотидные полиморфизмы (SNP - Single nucleotide polymorphism), соматические мутации, участки потери гетерозиготности (Loss of heterozygote - LOH), метилирование промотора гена *BRCA1*, несбалансированные хромосомные аномалии – делеции и амплификации, представляющие собой CNA – Copy Number Aberration (абберации числа копий). В 2014 году Prosperi M.C.F. с коллегами проанализировал 18 однонуклеотидных полиморфизмов в гене *BRCA1* и связали это с исходом рака молочной железы в зависимости от клинико-морфологических параметров (Prosperi M. C., 2014). Сопряженность аллельной делеции локуса гена *BRCA1* в ткани

опухоли с эффективностью различных химиотерапевтических препаратов в клинических исследованиях пока не рассматривалась. Относительно прогноза заболевания, в мета-анализе 2014 года, Zhong Q. et al. было установлено, что у больных РМЖ с наличием мутаций в гене *BRCA1* (не только *BRCA1 5382insC*) при применении платино-содержащих схем наблюдаются высокие показатели общей и безрецидивной выживаемости (Zhong Q., 2014). Таким образом, анализ литературы свидетельствует о том, что не только герминальные мутации в гене *BRCA1*, но соматические мутации, сопряжены с эффективностью химиотерапии и прогнозом заболевания. С учетом того, что в России основная и хорошо изученная герминальная мутация гена *BRCA1 5382insC*, обнаруживается всего в 9% случаев раннего (до 40 лет) РМЖ и 5-7% в общей группе больных (Имянитов Е., 2010), актуальным представляется изучение других форм изменчивости данного гена для определения их предиктивной и прогностической значимости с точки зрения персонализированного назначения лечения.

Цель работы: исследование соматического статуса гена *BRCA1* в опухоли больных раком молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии и его связи с эффективностью неoadъювантной химиотерапии и отдаленными результатами лечения.

Задачи исследования:

1. Оценить уровень экспрессии, наличие несбалансированных хромосомных аномалий, потерю гетерозиготности и метилирование промотора гена *BRCA1* в опухолевом материале до лечения и после неoadъювантной химиотерапии.
2. Оценить связь исследуемых параметров с основными клинико-патологическими характеристиками пациентов, их предиктивную и прогностическую значимость.
3. Изучить ковзаимодействие генов *BRCA1*, *NF-KB1* и *PARP1* в опухолевой ткани молочной железы.
4. Идентифицировать значимые предиктивные и прогностические маркеры для персонализированного выбора схемы НХТ.

Работа выполнена на базе НИИ онкологии Томского НИМЦ в лаборатории онковирусологии под руководством старшего научного сотрудника, кандидата биологических наук Цыганова Матвея Михайловича.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Рак молочной железы

Рак молочной железы (РМЖ) - одно из самых распространенных онкологических заболеваний среди женщин: по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Международного агентства по изучению рака (МАИР) на него приходится свыше 25% всех случаев заболевания и 14,7% смерти от рака (Давыдов М., 2014).

РМЖ объединяет в себе гетерогенную группу злокачественных новообразований эпителиальных клеток, выстилающих протоки молочных желез. В течение многих лет онкологи стремились классифицировать опухоли молочной железы, пытаясь обнаружить общие биологические механизмы. Появление техники микрочипов для тотального скрининга транскрипционной активности генома опухолевых клеток позволило на новом уровне подойти к пониманию причин фенотипической гетерогенности опухолей молочной железы (Кулигина Е., 2010).

В 2000 году Чарльз Пероу вместе с соавторами при помощи технологии экспрессионных микроматриц классифицировали РМЖ на пять ключевых молекулярно-генетических подтипов (Perou C. M., 2000). В зависимости от экспрессии рецепторов к эстрогенам, прогестеронам и эпидермальному фактору роста HER2, авторы выделили люминальный А, люминальный В, трижды негативный, HER2 положительный и подобный нормальной ткани молочной железы подтипы (Perou C. M., 2000; Prat A., 2011).

Таблица 1 - Подтипы рака молочной железы по Perou C

Подтип опухоли	Экспрессия маркеров
Люминальный А	ER+PR+HER2–
Люминальный В	ER+PR+/-HER2+/-
Трижды негативный	ER–PR–HER2–
HER2-позитивный	ER–PR–HER2+
Подобный нормальной ткани молочной железы	ER+/-PR–HER2–
<i>Примечание – ER – рецепторы эстрогенов, PR – рецепторы прогестерона, HER-2 – рецептор эпидермального фактора роста</i>	

Каждый подтип характеризуется индивидуальными особенностями течения заболевания, в частности ответом на химио-, лучевую и гормональную терапию и риском прогрессирования, включая органоспецифическое метастазирование (Polyak K., 2011). Считается, что неoadъювантная химиотерапия (НХТ) показана при люминальном В, трижды-негативном, и HER2-позитивном РМЖ. Для люминального А субтипа, в сравнении с остальными, определяются низкие показатели рецидивирования и высокие

показатели общей выживаемости, эта гистогенетическая группа рака молочной железы характеризуется высокой чувствительностью к гормональной терапии (тамоксифен, ингибиторы ароматазы), неоадьювантная химиотерапия данным пациентам не показана (Yanagawa M., 2012; Goldhirsch A., 2013). Люминальный тип В встречается в 14-18% случаев, для этой группы характерно более частое лимфогенное метастазирование и рецидивирование и низкая чувствительность к гормональной терапии (Parker J. S., 2009; Sotiriou C., 2009). Трижды-негативный рак молочной железы является агрессивной опухолью: часто имеет мутации гена *BRCA1*, метастазирует в лимфатические узлы и отдаленные органы, характеризуются более низкими показателями выживаемости. Трижды-негативный рак особенно чувствителен в НХТ по антрациклин- и таксан-содержащим схемам (Imyanitov E. N., 2007; Carey L., 2010). HER2-позитивный рак молочной железы часто имеет низкую степень дифференцировки, лимфогенное метастазирование, низкие показатели общей выживаемости, высокочувствителен к герцептину и не чувствителен к гормонотерапии (Theillet C., 2010; Burris III H. A., 2011; Slamon D., 2011).

В клинике рак молочной железы принято делить на следующие группы: первично операбельный рак молочной железы (0, I, IIA, IIB, IIIA стадии), местно-распространенный (первично не операбельный) рак молочной железы (IIIB, IIIC стадии), метастатический рак молочной железы или рецидив болезни.

В настоящее время комбинированное лечение больных РМЖ с операбельной формой (около 85% всех больных) может включать в разных сочетаниях операцию, лучевую терапию, системную химиотерапию или гормональную терапию в двух режимах: предоперационном, или неоадьювантном, и послеоперационном, или адьювантном (Семиглазов В. Ф., 2008). Неоадьювантная химиотерапия является необходимым компонентом комбинированного лечения женщин с местно-распространенным РМЖ IIIA, IIIB, или IIIC стадий и может быть использована у женщин с IIA (T_2N_0 или T_1N_1) или IIB (T_2N_1 или T_3N_0) стадиями РМЖ. Эффективность НХТ (полная и частичная регрессия) в зависимости от схемы лечения составляет 40-70%, при этом частота полной регрессии не превышает 10-15% (Kaufmann M., 2012).

Адьювантная химиотерапия (АХТ) – вспомогательное лекарственное лечение, дополняющее хирургические и лучевые методы. Целью АХТ является длительное подавление отдаленного метастазирования рака после хирургического лечения. Невидимые микрометастазы приводят к диссеминации болезни и, в конечном счете, являются причиной высокой смертности онкологических больных. Таким образом, цель

адьювантной терапии – увеличение выживаемости пациентов и продление безрецидивного периода (Загрекова Е., 2002; Семиглазов В., 2011).

1.2 Неоадьювантная химиотерапия

Неоадьювантная химиотерапия рака молочной железы изначально использовалась при локальном прогрессирующем неоперабельном заболевании для достижения хирургической резекции. Затем она была расширена до оперативного рака молочной железы с целью уменьшения опухолей, чтобы облегчить операцию по сохранению груди. Все чаще она рассматривается как лечение ранней стадии заболевания (Wolmark N., 2001). В настоящее время выделяют три основные задачи в отношении неоадьювантной химиотерапии при РМЖ: применение НХТ при больших размерах опухоли позволяет уменьшить объем первичной опухоли и уровень региональной лимфаденопатии (увеличение лимфатических узлов), что делает возможным выполнение радикального оперативного вмешательства (Семиглазов В., 2009). В случае операбельного РМЖ, использование НХТ позволяет сократить объем оперативного вмешательства у 50-60 % пациентов и проводить органосохранное лечение (Schwartz G. F., 2004). Два класса цитотоксических препаратов, которые проявляют активность к раку молочной железы – антрациклины и таксаны. В качестве «золотого стандарта» НХТ принято считать антрациклин-содержащие схемы - CAF и FAC. Все более широкое применение находят таксаны (Cardoso F., 2014; Sparano J. A., 2015).

Последние годы показали, что комбинированная химиотерапия более эффективна, чем терапия отдельными средствами. Комбинированная химиотерапия может преуспеть, где отдельные средства терпят неудачу вследствие химиорезистентности опухолевых клеток и гетерогенности опухоли (Семиглазов В., 2014).

Антрациклины. Чаще всего в клинической практике используют доксорубицин, который действует посредством взаимодействия с топоизомеразой, вызывая формирование ковалентных топоизомеразных комплексов II-ДНК, которые препятствуют работе фермента (Thorn C. F., 2011). Также антрациклины вызывают двунитевые разрывы ДНК. К основным представителям группы антрациклинов относятся доксорубицин, даунорубицин, идарубицин, эпирубицин и др.

Таксаны. Таксаны способствуют полимеризации микротрубочек веретена деления, а также цитоскелета опухолевой клетки (McGrogan B. T., 2008). В результате происходит остановка клеточного деления и гибель клетки. Также было установлено, что таксаны участвуют в активации факторов, типа TNF (Tsavaris N., 2002). После установления

активности доцетаксела (19–46%) и паклитаксела (19–44%) при РМЖ, в случаях, если была установлена резистентность к антрациклинам, были созданы комбинации антрациклинов с таксанами (Fountzilas G., 1996; Kruijtz C. M., 2000). В сравнительных исследованиях III фазы показаны преимущество применения комбинаций антрациклинов с таксанами по сравнению с антрациклиновыми схемами без включения таксанов (Поддубная И., 2003).

На сегодняшний день остро встает вопрос предсказания эффективности НХТ, которое позволило бы значительно оптимизировать использование химиотерапии, персонализировано назначать НХТ и АХТ, избавить пациентов с резистентными опухолями от токсичного лечения, и планировать адъювантную химиотерапию. Если рассматривать в общем виде, то в эффективности химиотерапии могут играть роль: 1. клинико-морфологические параметры, многие из которых связаны с прогнозом заболевания и выбором лечения; 2. молекулярно-генетические особенности опухоли (мутации, гипо- и гиперметилование генов, хромосомные aberrации и др.) и изменения в онкогенах и в генах-супрессорах, а также с изменения в паттерне экспрессии генов метаболических путей, транспортных генов, генов ферментных систем и т.п.

Для неoadъювантной химиотерапии многие клинико-морфологические параметры, такие как степень злокачественности, гистологический тип опухоли и пр. слабо ассоциированы с эффективностью (Rouzier R., 2002; Tiezzi D. G., 2007). Размер опухоли, лимфогенное метастазирование ассоциированы с эффективностью НХТ, но все эти маркеры показывают низкий уровень значимости. Так при T_xN_0 объективный ответ на НХТ достигается чаще, чем при T_xN_{1-2} ($p=0,04-0,003$) (Rouzier R., 2002; Smith I. C., 2002; Tiezzi D. G., 2007).

Увеличение количества курсов, использование современных цитостатиков и разработка новых режимов лечения может привести к повышению эффективности НХТ. Но все же наиболее перспективным направлением является определение факторов, позволяющих оценить чувствительность к НХТ. К ним относятся биомаркеры, характеризующие апоптоз (p53, Bcl-2), ангиогенез (вазоинтестинальный фактор роста - VEGF) и его рецепторы Flt-1 и Flt-2, пролиферацию (Ki-67), рецепторы ростовых факторов (her2/neu), ферменты, участвующие в метаболизме некоторых противоопухолевых препаратов (*TYMS*, *TYMP*, *GSTP1* и пр.) (Семиглазова Т., 2013).

Еще одним важным фактором для выбора химиотерапии является наследственный РМЖ, который составляет около 7-10 % всех случаев рака молочной железы. Данный вид рака сопряжен с нарушением целостности генома и связан с герминальными мутациями в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *p53*, *CHEK2* и *NBS1* (Имянитов Е., 2010). Кроме этого,

предполагается, что *BRCA1*-ассоциированный РМЖ характеризуются резистентностью к «золотому стандарту» терапии РМЖ – препаратам из группы таксанов. Было установлено, что применение доцетаксела с доксорубицином у больных с герминальной мутацией *BRCA1* всего в 40% (6/15) случаев сопряжено с клиническим ответом на НХТ (Byrski T., 2009), что значительно ниже по сравнению с использованием таксанов у *BRCA1*-негативных больных. Аналогичный результат был показан в двух других исследованиях (Wysocki P. J., 2008; Kriege M., 2012). Хотя в противоположность данным результатам, в исследовании D.S.P. Tan et al., было продемонстрировано, что применение паклитаксела в монорежиме у *BRCA1*-положительных больных раком яичника в 46% случаев оказывается эффективным (Tan D. S., 2008).

В то же время, *BRCA1* гетерозиготы по 5382insC показали высокую чувствительностью к препаратам платины, ответ на неоадьювантную химиотерапию наблюдался в 90% случаев (9/10 больных) (Byrski T., 2009). При этом результаты данного исследования были подтверждены более поздней работой автора: было исследовано 107 больных раком молочной железы с мутацией *BRCA1*. В результате объективный ответ на НХТ с использованием цисплатина наблюдался у 61% больных (65 случаев из 107) (Byrski T., 2014).

Таким образом, актуальность настоящего исследования обусловлена спорными имеющихся в мировой литературе сведениями о молекулярных механизмах, участвующих в ответе опухоли на применяемую химиотерапию как для общей группы больных, так и малочисленной группы с наследственным раком молочной железы.

1.3 Ген *BRCA1*

Ген *BRCA1* расположен на длинном плече 17 хромосомы (17q21.31; 24 экзона; 81 189 пн; 1863 а.к.) (PubMed; OMIM 113705) и кодирует ядерный фосфобелок, входящий в репарационный белковый комплекс (наряду с продуктами других генов, таких как *BRCA2*, *ATM*, *MSH2*, *MLH1* и др.), обладающий высокой чувствительностью к повреждениям ДНК (Lord C. J., 2012) (Рисунок 1). Продукт гена *BRCA1* связывает белки, ответственные за гомологичную рекомбинацию и репарацию двунитевых разрывов ДНК, компоненты систем репарации неспаренных оснований ДНК (*MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *ATP-MSH2* и др.), транскрипционные факторы (базальные - *HDAC*, *p300/CBP*, *SWI/SNF*; и сиквенс-специфические - *p53*, *Мус*, *E2F*, *ZBRK1*, *ATF*, рецептор эстрогенов, рецептор андрогенов), а также ряд других белков (Wang Q., 2000).

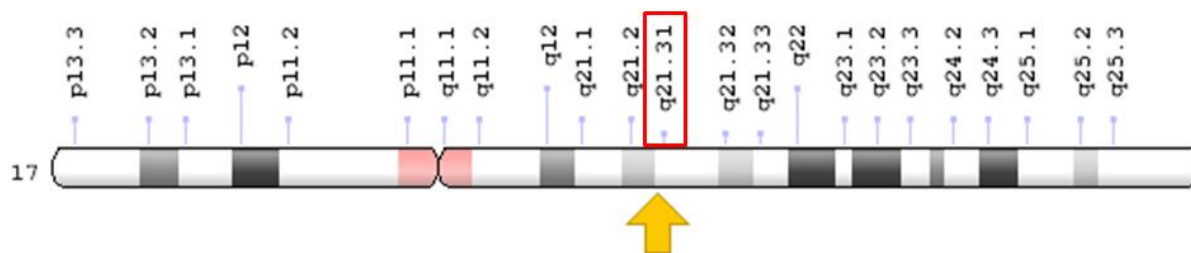


Рисунок 1 – Локализация гена *BRCA1* на длинном плече 17 хромосомы (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRCA1#location>)

BRCA1 является классическим опухолевым супрессором. Связывая эстрогеновые рецепторы, он репрессирует их транскрипционную функцию, тем самым подавляя избыточную пролиферацию клеток молочной железы и других эстроген-зависимых органов (Markowska J., 2013).

Продукт гена *BRCA1* участвует в обнаружении ненормального митоза и дальнейшей индукции апоптоза для предотвращения репликации анеуплоидных клеток (Mingo-Sion A. M., 2004; Morales-Cano D., 2013). *BRCA1*, взаимодействуя с компонентами centrosом (Nm23 и др.), принимает участие в обеспечении правильной сегрегации хромосом во время митоза (Markowska J., 2013). В клетках с дефектным *BRCA1*, за счет снижения активности репарации ДНК, наблюдается сильная генетическая нестабильность, повышается частота возникновения спонтанных или индуцированных мутагенами генетических изменений - генных мутаций, хромосомных транслокаций, анеуплоидии и т.д. (Rebbeck T. R., 2015). Вследствие чего риск развития РМЖ у носителей мутантного гена *BRCA1* многократно увеличивается (Торопова Н. Е., 2015).

BRCA1 является первым геном, для которого было определено явное участие в этиологии семейного рака молочной железы (Johnson N., 2007). Так различные мутации в гене *BRCA1* (5382insC; 2080delA; 300T/G; 3819delGTAAA; 3875del4; 4153delA; 617delLT и др.) в 45% случаев ответственны за развитие только рака молочной железы, а более чем в 90% случаев – за развитие рака молочной железы, сочетающегося с раком яичников. Герминальное повреждение гена *BRCA1* также увеличивает риск развития рака шейки и тела матки, рака поджелудочной железы и рака толстой кишки (Kadouri L., 2007).

В 1994 году была выявлена герминальная мутация *BRCA1* 5382insC в 20-м экзоне и показана ее сопряженность с высоким риском развития наследственного рака молочной железы и яичников (Simard J., 1994) (Рисунок 2). Это наиболее распространенная мутация гена, которая составляет 80% мутаций в гене *BRCA1* и 60% от общего объема мутаций в генах *BRCA1/2* особенно для славянского населения (Palmero E. I., 2016). При мутации

BRCA1 5382insC добавляется один нуклеотид – цитозин, в позицию 5382, в результате сдвигается рамка считывания матричной РНК и возникает преждевременный стоп-кодон в позиции 1829. Таким образом, синтезируется укороченный белок *BRCA1* и это сопровождается нарушением его функциональных свойств, а также повышенной чувствительностью к генотоксическим воздействиям и нестабильности генома, что в итоге увеличивает вероятность развития РМЖ и рака яичников (Имянитов Е., 2010).

```

Original DNA seq ... AGT ATT GAC T...
5382insC DNA seq ... AGT ATT CGA CT..
                        ↑
                    C - added

```

Рисунок 2 – Герминальная мутация *BRCA1* 5382insC, (http://errantscience.com/blog/2013/06/26/we_need_to_talk_about_fid_o/)

Спустя 15 лет после открытия герминальной мутации *BRCA1* 5382insC было обнаружено, что пациенты, имеющие данную мутацию обладают высокой чувствительностью к препаратам платины. В работах Byrski T. et al ответ на неоадьювантную химиотерапию (НХТ) наблюдался в 90% случаев (9/10 больных) (Byrski T., 2009). В своей более поздней работе автор подтверждает результаты своих исследований: было исследовано 107 больных с *BRCA*-ассоциированным раком молочной железы. В результате объективный ответ на НХТ с использованием цисплатина наблюдался у 61% больных (65 случаев из 107) (Byrski T., 2014).

Кроме того, продукт данного гена также играет роль в регуляции митоза опухолевой клетки и предполагается, что *BRCA1*-ассоциированный РМЖ характеризуются резистентностью к «золотому стандарту» терапии РМЖ – препаратам из группы таксанов. Препараты указанного класса связываются с β -тубулином и стабилизируют микротрубочки, тем самым блокируя их деполимеризацию и останавливая процесс формирования клеточного веретена. Это приводит к нарушению митоза (Morales-Sano D., 2013; Kommoss S., 2016). Было показано, что применение доцетаксела с доксорубицином у больных с герминальной мутацией *BRCA1* всего в 40% (6/15) случаев сопряжено с клиническим ответом на НХТ, что значительно ниже по сравнению с использованием таксанов у *BRCA1*-негативных больных. В двух других исследованиях был показан аналогичный результат (Wysocki P. J., 2008). В ряде работ на клеточных линиях было показано, что индукция экспрессии гена *BRCA1* после воздействия паклитаксела приводит к активации контрольной точки митоза, или остановки клеточного

деления, и последующей клеточной гибели (Mullan P. B., 2001; Quinn J. E., 2003). Иначе говоря, для того чтобы изменения, происходящие в клетках опухоли под действием таксанов, привели к остановке ее деления, необходимо присутствие белка *BRCA1*. При отсутствии полноценного продукта гена *BRCA1* реализация противоопухолевого действия данного класса препаратов затруднена (James C. R., 2007; Hedgepeth S. C., 2015). Таким образом, дефицит продукта гена *BRCA1*, обусловленный его мутацией (при большинстве герминальных мутациях, как правило, образуется стоп-кодон), приводит к тому, что апоптоз опухолевых клеток под действием таксанов не индуцируется.

1.4 Гомологичная рекомбинация двунитевых разрывов ДНК

При двуцепочечных разрывах ДНК в клетках мелкоклеточных основным путем восстановления является гомологичная рекомбинация (ГР). ГР - это механизм восстановления ДНК с высокой точностью, который имеет решающее значение для эффективного восстановления разрывов двуцепочечной ДНК, и в то же время является маркером чувствительности к химиотерапии при раке молочной железы (Prakash R., 2015).

ГР-репарация может быть инициирована посредством возникновения двунитевых разрывов и остановкой репликации. Как правило, ГР начинается с деградации концов ДНК с образованием 3' - концевой ssDNA. Белок RAD51 связывается с ssDNA, который способствует проникновению нити в гомологичный дуплекс, чтобы инициировать синтез репарации (Morrison S. W., 2015). В ходе вторжения цепи между торчащим 3'-концом внедряющейся цепи и гомологичной хромосомой образуется D-петля. После этого ДНК-полимераза продлевает 3'-концы и получившаяся перекрестная структура называется структурой Холлидея. Вслед за этим на внедрённой цепи (то есть на одном из выступающих 3'-концов) происходит синтез ДНК, эффективно восстанавливая её комплементарно гомологичной хромосоме в том месте, откуда была вытеснена D-петля. После этого момента идет разделение на 2 пути: путь репарации двуцепочечных разрывов (DSBR-путь), также известный как модель двойной структуры Холлидея, и путь синтезозависимого отжига цепи (SDSA-путь) (Рисунок 3). При DSBR-пути на втором выступающем 3'-конце (который не участвовал во внедрении) также образуется структура Холлидея с цепью гомологичной хромосомы. Затем следует кроссинговер, но пройдет он или нет, определяется тем, как будет разрезана структура Холлидея. Кроссинговер может произойти, если одна структура Холлидея будет разрезана по пересекающимся нитям, а другая нет. Продукт, не подвергшийся кроссинговеру, получится лишь в том случае, если обе структуры разрезаны по пересекающимся нитям (Альбертс Б., 2015). ГР путем SDSA

приводит к образованию хромосом, не прошедших процесс кроссинговера. После образования структуры Холлидея ДНК-полимераза продлевает внедрённую цепь комплементарно матрице, и одновременно с этим комплементарно вытесненной цепи синтезируется оставшая часть поврежденной ДНК (Helleday T., 2007).

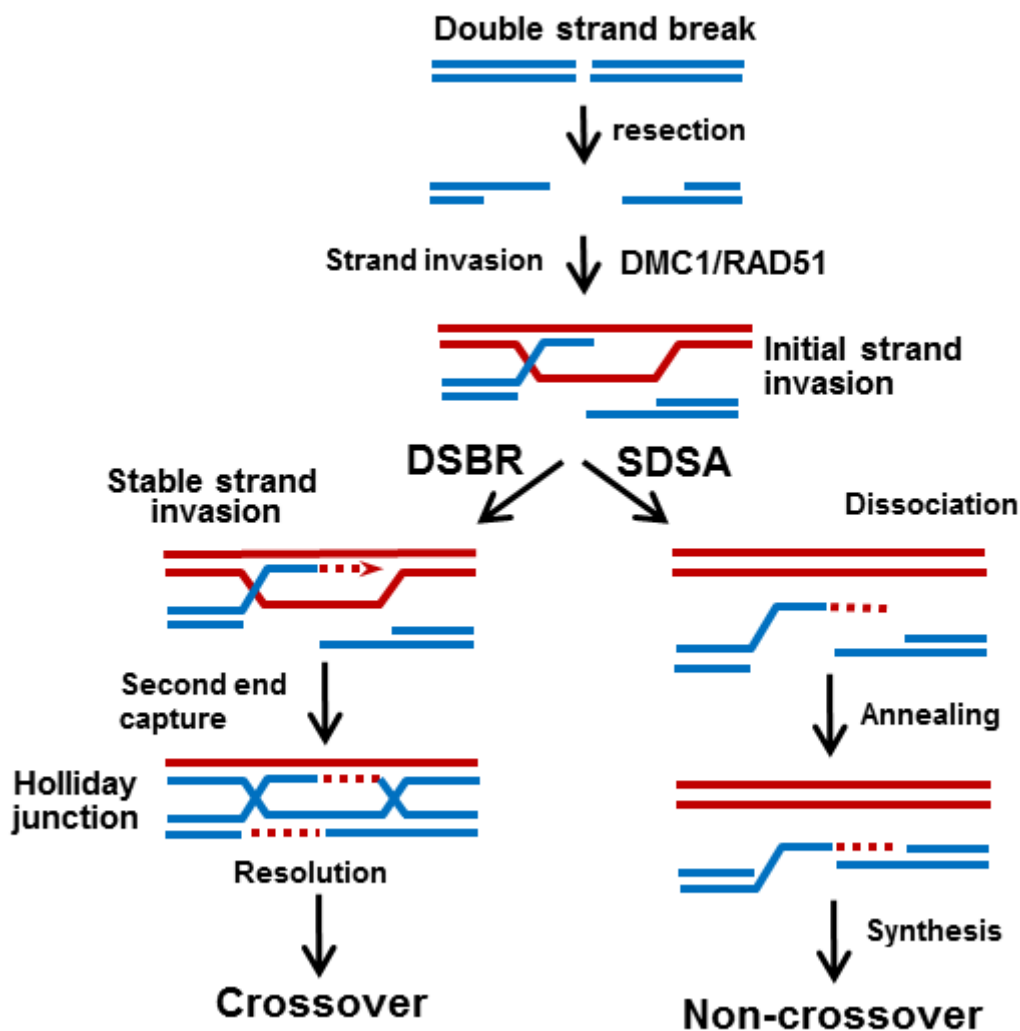


Рисунок 3 – Схематичное изображение гомологичной рекомбинации двунитевых разрывов ДНК (Helleday, T. et al., 2007)

Дефицит гомологичной рекомбинации ДНК: связь с BRCA1

В 1997 году на основании того, что *BRCA1* колокализуется с RAD51 в ядерных очагах митотических клеток, было сделано предположение о вовлечении данного гена в процесс ГР (Scully R., 1997). На данный момент есть прямые доказательства участия *BRCA1* в процессах рекомбинации. На клетках мыши установлено, что дефицит *BRCA1* в эмбриональных стволовых клетках приводит к снижению восстановления ГР (Moynahan M. E., 2001). Нарушение гомологичной рекомбинации также наблюдалось в раковых клетках человека, истощенных по *BRCA1* (Zhang J., 2005).

При дефиците гомологичной рекомбинации (HRD – homologous recombination deficiency) наблюдается геномная нестабильность, в частности различные хромосомные абберации, что подтверждает ее физиологическое значение в клетках (Xu X., 1999). Мутации *BRCA1* являются одной из наиболее известных этиологий HRD. Другим механизмом, который приводит к дефициту является метилирование промотора гена *BRCA1*. При нарушении ГР включаются альтернативные пути репарации ДНК, такие как нехомологичное присоединение конца (NHEJ). Они становятся основными путями, используемыми для репарации разрывов ДНК. Однако они подвержены большому количеству ошибок и приводят к быстрому накоплению соматических мутаций, которые увеличивают риск канцерогенеза (Lord C. J. Ashworth A., 2012).

Хотя главной функцией *BRCA1* является участие в репарации ДНК посредством гомологичной репарации, этот ген прямо или косвенно взаимодействует с большим количеством молекул, тем самым обладая свойством плейотропии. Было показано, что при дефиците этого гена, в клетке наблюдаются различные эффекты: восстановление дефектной молекулы ДНК, прохождение контрольных точек дефектного клеточного цикла, повышенный апоптоз, повреждение веретена деления и хромосом (Gudmundsdottir K., 2006; Moynahan M. E., 2010).

PAPR1 и NF-κB

При отсутствии функциональных генов *BRCA* двунитевые разрывы ДНК не могут подвергнуться репарации путем гомологичной рекомбинации, и вместо этого, репарация может проводиться альтернативными путями, например, за счет активации гена *PAPR1* (Rouleau M., 2010)

Ген *PAPR1* локализуется на 1 хромосоме (1q42.12; 23 экзона; 47410 пн; 1014 а.к.) (PubMed; OMIM 173870) и кодирует хроматин-ассоциированный фермент поли (АДФ-рибозил) трансферазу, который модифицирует различные ядерный белки. Эти модификации участвуют в регуляции таких процессов, как дифференцировка, пролиферация и трансформация опухоли, а также в регуляцию молекулярных событий, участвующих в восстановлении клетки от повреждения ДНК (Weil M. K., 2011).

Группа ученых во главе с Sydney Shall в 1980 году показала, что применение ингибиторов *PAPR* может оказывать дополнительное цитотоксическое действие алкилирующих агентов на опухолевые клетки (Durkacz B. W., 1980). Клинические исследования показали, что *BRCA*-дефицитные опухоли чувствительны к ингибиторам *PAPR* и платиновым агентам (Durkacz B. W., 1980). Поэтому в данный момент, лечение *BRCA*-ассоциированного рака яичника проводят с помощью ингибиторов *PAPR1*.

В последнее время все больше появляется работ по изучению другого гена, транскрипционного нуклеарного фактора κB (*NF- κB*) – фактора транскрипции, отвечающего за адаптивные реакции клеток, в частности в ответ на повреждение ДНК, а так же контролирующей экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла (PubMed; OMIM 164011). В недавнем исследовании было показано, что *NF- κB* участвует в опосредованной резистентности опухолевых клеток (с диким типом *BRCA1*) к ДНК-повреждающим агентам (Harte M. T., 2014). Установлено, что у *BRCA1*-дефицитных опухолевых клеток, не способных к репарации ДНК, наблюдается высокая экспрессия ядерного *NF- κB* . Это приводит к ингибированию процессов апоптоза и возникновению химиорезистентности (Sau A., 2016). Показано, что aberrантная активность *NF- κB* может частично отвечать за прогрессирование рака молочной железы, а гиперэкспрессия данного гена может быть связана с метастазированием опухоли, что делает *NF- κB* перспективным маркером в лечении больных РМЖ (Wu J. T., 2005; Sau A., 2016).

В этой связи интересным представляется изучение aberrаций числа копий генов *BRCA1*, *NF- κB* и *PARP1* в опухоли молочной железы, влияния копийности на эффект химиотерапевтического лечения и прогноз заболевания, с целью возможного использования полученных данных в качестве предиктивных и прогностических маркером.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

2.1.1 Объект исследования

В ходе работы были обследованы 140 больных раком молочной железы с морфологически верифицированным диагнозом и клинической стадией заболевания ПА – ПІВ ($T_{1-4}N_{0-3}M_0$) в возрасте 25–68 лет (средний возраст $47,43 \pm 0,78$ лет), которые проходили в 2006–2018 годах лечение в клиниках НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра (г. Томск, Россия). Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. (исправленной в 1975 и 1983 гг.) и с разрешения локального этического комитета института, при этом все пациентки подписали информированное согласие на исследование. Больные имели ПА – ПІВ стадии заболевания и в соответствии с «Consensus Conference on Neoadjuvant Chemotherapy in Carcinoma of the Breast, April 26 – 28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania» (Schwartz G. F.Hortobagyi G. N., 2004) в неоадьювантном режиме получали 2-8 курса химиотерапии (ХТ) FАC (фторурацил, доксорубицин, циклофосфан), САХ (циклофосфан, доксорубицин, кселода), СР (циклофосфан, цисплатин) или монотерапию таксотером.. Через 3-5 недель после неоадьювантной химиотерапии проводилась операция в объеме радикальной или подкожной мастэктомии, радикальной резекции, секторальной резекции с аксиллярной лимфаденэктомией или другого вида органосохранной операции. Далее больным проводили по 2 курса адьювантной химиотерапии (АХТ) по схеме FАC, при этом лучевую терапию и/или гормональное лечение назначали по показаниям. Все пациенты не имели герминальных мутаций гена *BRCA1*.

Таблица 2 – Клинико-морфологические параметры обследованных больных РМЖ

Клинико-морфологический параметр		Число больных (абс. ч., %)
Возраст (лет)	≤45	58 (41,4%)
	>45	82 (58,6%)
Менструальный статус	Пременопауза	76 (54,3%)
	Постменопауза	64 (45,7%)
Гистологический тип	Инвазивный протоковый рак	105 (75,0%)
	Инвазивный дольковый рак	22 (15,7%)
	Медулярный рак	7 (5,0%)
	Другие типы	6 (4,3%)
Размер опухоли	T ₁	21 (15,0%)
	T ₂	101 (72,1%)
	T ₃	9 (6,4%)
	T ₄	9 (6,4%)
Лимфогенное метастазирование	N ₀	60 (42,9%)
	N ₁	57 (40,7%)
	N ₂	11 (7,9%)
	N ₃	12 (8,6%)
Рецепторы эстрогена	+	88 (62,9%)
	–	52 (37,1%)
Рецепторы прогестерона	+	82 (58,6%)
	–	58 (41,4%)
Рецепторы эпидермального фактора роста HER2	0/+	102 (72,9%)
	++	21 (15,0%)
	+++	17 (12,1%)
Молекулярный подтип	Люминальный В	103 (73,6%)
	Трижды негативный	24 (17,1%)
	HER2-позитивный	13 (9,3%)
Гистологическая форма	Уницентрическая	90 (64,3%)
	Мультицентрическая	50 (35,7%)
Схема НХТ	СAX	32 (22,9%)
	FAC	55 (39,2%)
	Таксотер	42 (30,0%)
	CP	11 (7,9%)
Ответ на НХТ	Прогрессирование	12 (8,6%)
	Стабилизация	35 (25%)
	Частичная регрессия	75 (53,5%)
	Полная регрессия	18 (12,9%)

Примечание – HER2 – тестирование выполнено в соответствии с рекомендациями Американского Общества Клинической Онкологии/Колледжа Американских Патологов [64]; T1 – микроинвазия до 0,1 см; T2 – опухоль до 5 см; T3 – опухоль более 5 см; T4 – опухоль любого размера с прямым распространением на грудную стенку или кожу; N0 – нет метастазов в региональных лимфатических узлах; N1 – метастазы в смещаемых подмышечных лимфатических узлах на стороне поражения; N2 – спаянные метастазы в подмышечных лимфатических узлах на стороне поражения, N3 – метастазы в подключичных лимфатических узлах на стороне поражения либо клинически определяемые метастазы во внутригрудных лимфатических узлах при наличии клинически явного поражения подмышечных лимфатических узлов, либо метастазы в надключичные лимфатические узлы на стороне поражения

Эффективность предоперационной химиотерапии оценивали по критериям Всемирной организации здравоохранения Международного противоракового союза (International Union Against Cancer) (Hayward J., 1977) с помощью ультразвукового исследования (УЗИ) и/или маммографии, которые проводили до лечения, после 2 курсов НХТ и перед операцией. Регистрировали полную регрессию (100% уменьшение опухоли), частичную регрессию (уменьшение объема опухоли более, чем на 50%), стабилизацию (снижение объема менее, чем на 50% или увеличение не более, чем на 25%) и прогрессирование (увеличение объема опухоли более, чем на 25%). Согласно международным рекомендациям, при проведении предоперационной химиотерапии больные РМЖ со стабилизацией или прогрессированием опухоли составили группу с отсутствием ответа на НХТ, а больные с частичной регрессией – группу с объективным ответом (Kaufmann M., 2012).

2.1.2 Материал исследования

Материалом для исследования служили биопсийные опухолевые образцы (объемом $\sim 10 \text{ мм}^3$), полученные под контролем УЗИ и операционные образцы после НХТ (объемом $\sim 30\text{-}90 \text{ мм}^3$) от 140 пациентов. Материал опухоли помещали в раствор RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, USA). После 24-часовой инкубации при температуре $+4^\circ\text{C}$, образцы опухоли сохраняли при температуре -80°C для дальнейшего выделения РНК и ДНК.

2.2. Методы исследования

2.2.1 Выделение РНК

Тотальная РНК была выделена из 140 парных образцов до лечения и после НХТ. РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plus mini Kit, содержащего ДНК-азу I (Qiagen, Germany, #74134) в соответствии с инструкцией производителя. Выделяли РНК с использованием колоночного метода. Применялись специализированные колонки, содержащие кварцевую мембрану, которая специфично связывает РНК в клеточном лизате.

На спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA) оценивали концентрацию и чистоту выделения РНК. Концентрация РНК составила от 20 до 100 нг/мкл, $A_{260}/A_{280}=1,85\text{-}1,95$; $A_{260}/A_{230}=1,90\text{-}2,00$. Целостность РНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA)

и набора R6K ScreenTape (Agilent Technologies, USA #5067-5367). RIN составил 5,5 – 7,5 (Рисунок 4).

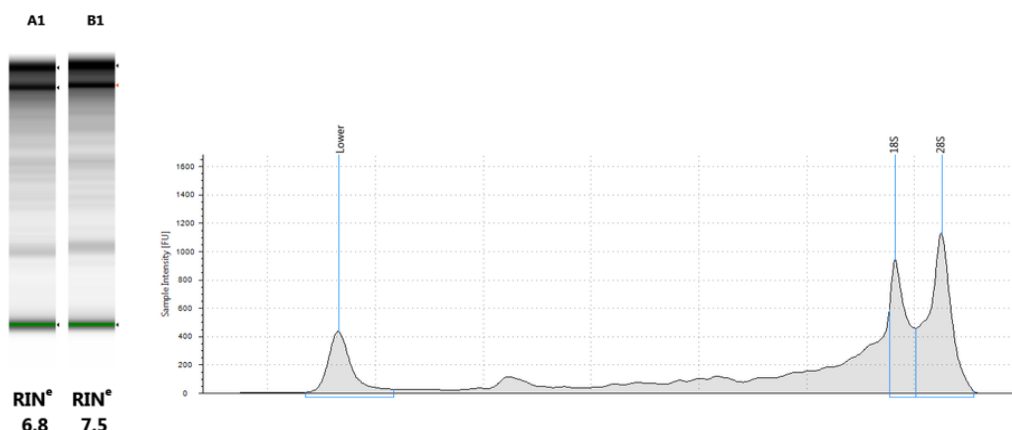


Рисунок 4 – Электрофореграмма и денситограмма тотальной РНК, выделенной из опухоли молочной железы при помощи набора RNeasy Mini Kit Plus (Qiagen, Germany)

Примечание – Капиллярный электрофорез выполнен на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA). Видны бенды 28S и 18S рибосомальной РНК и показатель целостности РНК - RIN (RNA Integrity Number) составил 7.9. Спектрофотометрические показатели этого образца РНК – $A_{260}/_{280}=1,85$, $A_{260}/_{230}=2,01$, концентрация – 103,7 нг/мкл

2.2.2 Выделение ДНК

ДНК из опухолевой ткани молочной железы выделяли из 30 парных образцов при помощи набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany # 51304) в соответствии с инструкцией производителя. В основе лежит методика выделения ДНК образцов опухолевой ткани молочной железы благодаря спин - колонкам. ДНК специфично связывается с силикагельной мембраной QIAamp колонок, в то время как загрязнители проходят через мембрану в сток. Производится отмывка в ходе которой удаляются ингибиторы ПЦР, в результате, остается чистая ДНК, которая элюируется водой.

Концентрацию и чистоту выделения ДНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA). Концентрация составила от 50 до 300 нг/мкл, $A_{260}/_{280}=2,10-2,35$; $A_{260}/_{230}=2,15-2,40$. Целостность ДНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) с использованием набора Agilent Genomic DNA ScreenTape System Quick Guide (Agilent Technologies, USA # 5067-5365) (Рисунок 5). На рисунке 5 хорошо видно, что фрагменты

ДНК, в основном, имеют массу более 48 kbp. Выделенная ДНК хранилась при -80°C в низкотемпературном морозильнике (Sanyo, Japan) и использовалась для дальнейших микроматричных исследований.

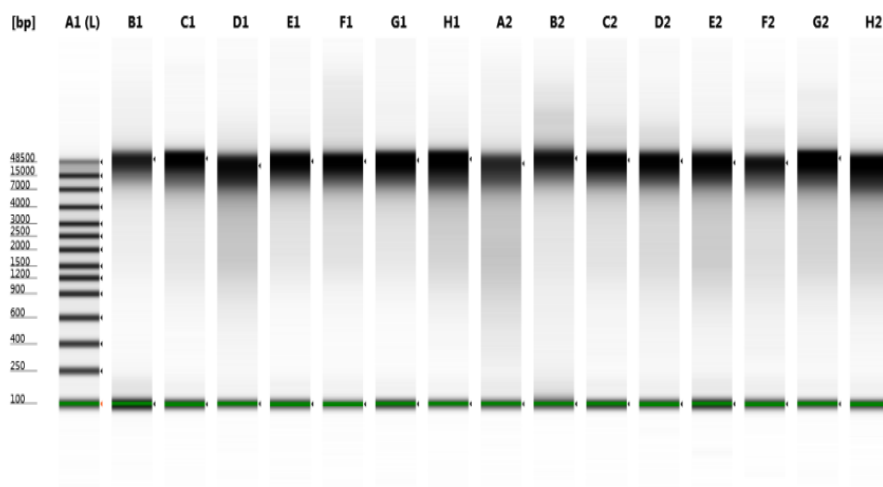


Рисунок 5 – Капиллярный электрофор ДНК, выделенной из биопсийных образцов опухоли молочной железы. Видна хорошая целостность ДНК, масса ДНК более 48 kbp. A1 – маркер молекулярной массы; B1..H2 – образцы ДНК опухолей больных; нижний бенд на каждой дорожке – маркер прохождения электрофореза.

2.2.3 Капиллярный электрофорез

Целостность РНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) с использованием набора Agilent R6K ScreenTape System Quick Guide. Предварительно подготовленную смесь, состоящую из 4 мкл R6K Sample Buffer и 1 мкл образца РНК, перемешивали и инкубировали при 72°C 3 мин, затем охлаждали образец 2 мин при -20°C и помещали в прибор 2200 TapeStation (Agilent Technologies, USA). Для оценки целостности ДНК использовали набор Agilent Genomic DNA ScreenTape System Quick Guide. К 1 мкл исследуемого образца ДНК добавляли 10 мкл Genomic DNA Sample Buffer, перемешивали на вортексе, центрифугировали для осаждения капель и помещали пробу в прибор для капиллярного электрофореза 2200 TapeStation. Дополнительно первой пробиркой в приборе ставится маркер молекулярной массы, в объеме 4 мкл. Проверку чистоты ПЦР-продуктов проводили с набора Agilent D1000 ScreenTape Assay, позволяющий анализировать качество и чистоту полученного ампликона от 35 до 1000 bp.

2.2.4 Количественная ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени

Уровень экспрессии гена *BRCA1* (PubMed NM_007294.3) оценивали при помощи обратнo-транскриптазной количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) с оригинальными праймерами и зондами по технологии TaqMan (*Forward primer* 5'-acagctgtgtgggtgcttctgtg-3'; *Reverse primer* 5'-cattgtcctctgtccaggcatc-3'; *Probe* FAM-5'-catcattacccttggcacaggtgt-3'-BHQ1; Amplicon 107 bp) на амплификаторе Rotor-Gene-6000 (Corbett Research, Australia), (Рисунок 6). Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора RevertAid™ (Thermo Fisher Scientific, USA) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией к набору.

В качестве гена-рефери использовались ген: *GAPDH* (glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase), уровень экспрессии гена *BRCA1* нормализовался по отношению к экспрессии генов-рефери и измерялся в условных единицах. Относительная экспрессия оценивалась с помощью метода Pfaffl (Pfaffl M. W., 2001). В качестве калибратора использовалась пулированная от 20 пациентов РНК, выделенная из нормальной ткани молочной железы, полученной во время операции от больных, которым не проводилась НХТ.

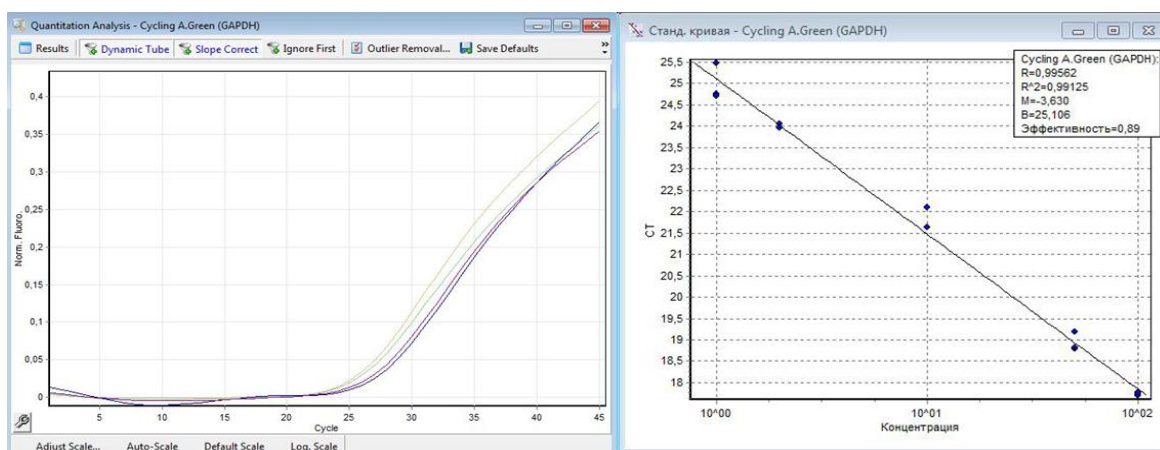


Рисунок 6 – Кинетические кривые амплификации и стандартная кривая для количественной ПЦР гена рефери *GAPDH*

2.2.5 Анализ метилирования промотора гена *BRCA1*

Анализ метилирования промотора гена *BRCA1* проводили при помощи GLAD-ПЦР-анализа. Метод основан на использовании метилзависимой ДНК эндонуклеазы *GlaI*,

которая узнает и расщепляет последовательность 5'-R(5mC)↑GY-3'/3'-YG↑(5mC)R-5' с образованием тупых концов как указано стрелками (Tarasova G. V., 2008). Метод включает три последовательных этапа: 1. Гидролиз ДНК метилзависимой ДНК эндонуклеазой Glal. 2. Сшивку фрагментов с универсальным адаптером. 3. ПЦР в реальном времени с детекцией в FAM канале. (Структура геномного праймера и зонда соответствует последовательности ДНК, расположенной рядом с анализируемым сайтом 5'-RCGY-3', структура гибридного праймера соответствует структуре универсального адаптера) (Рисунок 7). ПЦР продукт нарабатывается только в случае наличия сайта R(5mC)GY в интересующей точке.

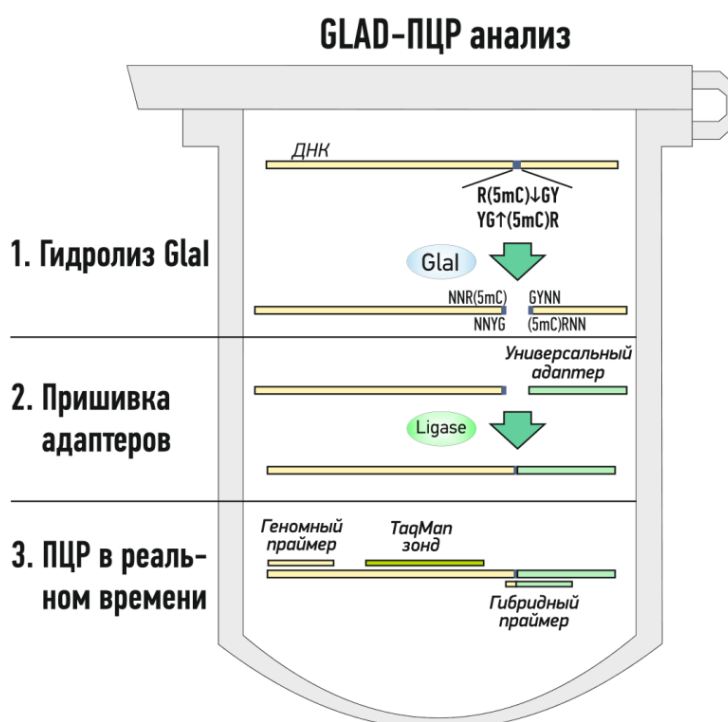


Рисунок 7 - Общая схема проведения GLAD-ПЦР-анализа

Анализ проводили с помощью набора для GLAD-ПЦР анализа (СибЭнзим, Россия, #K009S) в соответствии с инструкцией производителя на амплификаторе «CFX96» (Bio-Rad, USA). Оценка количества копий ДНК, содержащих метилированную промоторную область гена *BRCA1* осуществлялась относительно регуляторной области гена *URB1*, используемого в качестве калибратора.

2.2.6 Микроматричный анализ

Микроматричный анализ проводили на микроматрицах (ДНК-чипах) высокой плотности фирмы Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array. Микроматрица представляет

собой твердый носитель небольшого размера (например, стекло или кремний) с прикрепленными к нему в определенном порядке короткими олигонуклеотидами (8-80 пн) или фрагментами ДНК (более 100 пн). Прикрепление одного из компонентов реакции к подложке позволяет проводить множество реакций одновременно пространственно разделив детекцию отдельных фрагментов ДНК (консервативных участков генома или однонуклеотидных полиморфизмов - SNPs). CytoScan™ HD Array содержит 2 млн 670 тыс. маркеров – 1 млн 900 тыс. непалиморфных маркеров и более 750 тыс. однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), позволяющих определить структурные вариации более чем 36 тысяч генов. Наличие полиморфных маркеров на микроматрице позволяет, также определить участки с потерей гетерозиготности (LOH). Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя на системе Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, USA). Процедура микроматричного анализа представлена на рисунке 8.



Рисунок 8 – Схематическая последовательность микроматричного анализа

Для обработки результатов микрочипирования использовали программу «Chromosome Analysis Suite 3.3» (Affymetrix, USA), которая разработана специально для анализа результатов чипирования на матрице CytoScan™ HD Array. При помощи программы в хромосомах определяли несбалансированные хромосомные aberrации – делеции и ампликации (Loss и Gain), представляющие собой CNA – Copy Number Aberration (aberrации числа копий). Поскольку в образцах опухолевой ткани обязательно

присутствуют стромальные элементы и другие нормальные клетки, в полученной ДНК высок процент нормальной геномной ДНК. Микрочип CytoScan™ HD Array позволяет выявлять 5% и более мутантной ДНК. Практически во всех случаях CNA были мозаичными, т.е. мутантная опухолевая ДНК определялась на фоне нормальной ДНК. Процент мутантной ДНК – статус числа копий (CN-state), колебался от 15 до 88%. В программе «Chromosome Analysis Suite 3.2» мозаицизм графически представляется аллельными пиками (Allele Peaks) с 4-мя «полосками» (AAA, AAB, ABB, BBB). Показатель snpQC колебался от 9 до 25 и отрицательно коррелировал с частотой CNA. Даже при низких значениях snpQC ширина Allele Peaks была «хорошей» (по классификации базы progentix (Cai H., 2012)) для идентификации CNA.

2.2.6 Цифровая ПЦР

Для проверки наличия CNA гена *BRCA1* в опухоли молочной железы использовалась цифровая ПЦР (Droplet Digital PCR - Система ddPCR QX200, Bio-Rad, USA), которая сочетает в себе технологию использования капель на основе водно-масляной эмульсии с применением технологии микроструйной автоматики. В качестве флуоресцентных красителей используется FAM и/или HEX (или VIC) по технологии TaqMan. Праймеры и зонды представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Последовательность праймеров и проб генов рефери и *BRCA1* для цПЦР

Гены	Последовательность
<i>SLC22A7</i> NG_000006.12 Amplicon 75 bp	F 5'- gacaagtgccctaattctctgac -3'
	R 5'- ggggtgtggttggtggttc -3'
	Probe HEX 5'- ccaagagtcaatgttccacctc -3' BHQ2
<i>KPNA1</i> NG_000003.12 Amplicon 84 bp	F 5'- ttacattgctaccaatcttt -3'
	R 5'- cctccatctgacataacttcttc -3'
	Probe HEX 5'- cagtattcaagcggagaaatgttg -3' BHQ2
<i>CASR</i> NG_009058.1 Amplicon 96 bp	F 5'- ctcaaaaagccacctccac -3'
	R 5'- gacctggagagaaccaagaac -3'
	Probe HEX 5'- ctacgacaccttctactcactcac -3' BHQ2
<i>BRCA1</i> NG_005905.2 Amplicon 85 bp	F 5'- ctctgtcattcttctgtgctc -3'
	R 5'- gaaaagacaggttacatacagcag -3'
	Probe FAM 5'- cggagatagagaggtcagcgattc -3' BHQ1

Основными этапами цифровой ПЦР являются: 1. Генерация капель, которая позволяет производить разделение каждого образца на 20 000 капель нанолитрового объема; 2. ПЦР-амплификация; 3. Подсчет капель, дающих флуоресцентные положительные и отрицательные сигналы, для расчета концентрации целевой ДНК.

Результат анализируется с использованием программного обеспечения QuantaSoft™ 1.7.4.0917. Оно измеряет количество положительных и отрицательных капель для каждого флуорофора в каждом образце (Рисунок 9).

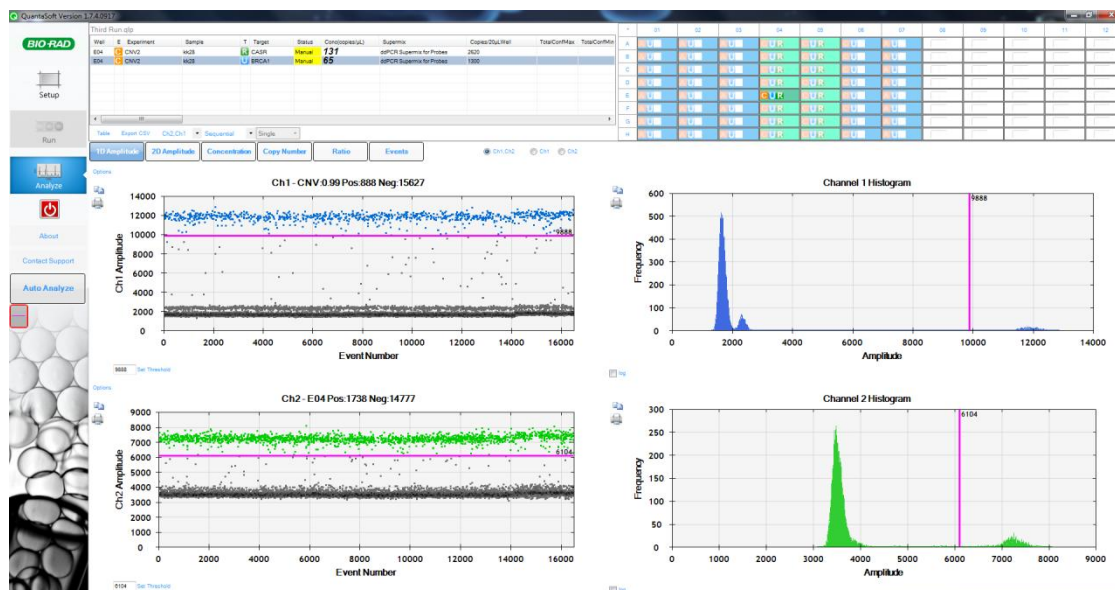


Рисунок 9 – Диалоговое окно программного обеспечения QuantaSoft™ 1.7.4.0917 с примером анализа CNA гена *BRCA1*

CNA гена *BRCA1* в опухолевой ткани определяется по отношению к референсным локусам генома человека (гены *SLC22A7*, *CASR*, *KPNA1*). Последовательность праймеров и зондов была подобрана при помощи программы Vector NTI 11.5 (Invitrogen, USA) с использованием генетического банка данных www.ncbi.nlm.nih.gov.

2.2.6 Статистические методы

Статистическая обработка данных была проведена с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 10.0» (StatSoft Inc., USA). Для каждой выборки вычисляли среднее арифметическое, среднюю квадратичную ошибку, показатели квартилей. Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий Вилкоксона-Манна-Уитни, непараметрический критерий Вилкоксона для связанных групп. Различия между исследуемыми группами считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Сравнение частот по качественным данным анализировали при помощи двухстороннего критерия Фишера. Для анализа выживаемости использовались кривые выживаемости, построенные по методу Каплана-Майера.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Глава 3 (страницы 27–43) содержит неопубликованные результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016 г.)

Глава 3 (страницы 27–43) содержит неопубликованные результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016 г.)

Глава 3 (страницы 27–43) содержит неопубликованные результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016 г.)

Глава 3 (страницы 27–43) содержит неопубликованные результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016 г.)

Глава 3 (страницы 27–43) содержит неопубликованные результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016 г.)

Глава 3 (страницы 27–43) содержит неопубликованные результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016 г.)

Глава 3 (страницы 27–43) содержит неопубликованные результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016 г.)

Глава 3 (страницы 27–43) содержит неопубликованные результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016 г.)

Глава 3 (страницы 27–43) содержит неопубликованные результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016 г.)

Глава 3 (страницы 27–43) содержит неопубликованные результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016 г.)

Глава 3 (страницы 27–43) содержит неопубликованные результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016 г.)

Глава 3 (страницы 27–43) содержит неопубликованные результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016 г.)

Глава 3 (страницы 27–43) содержит неопубликованные результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016 г.)

Глава 3 (страницы 27–43) содержит неопубликованные результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016 г.)

Глава 3 (страницы 27–43) содержит неопубликованные результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016 г.)

Глава 3 (страницы 27–43) содержит неопубликованные результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016 г.)

Глава 3 (страницы 27–43) содержит неопубликованные результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъята из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016 г.)

Выводы:

1. Оценен уровень экспрессии гена *BRCA1* в опухолевой ткани молочной железы до и после проведения неoadъювантной химиотерапии, при помощи микроматричного исследования на ДНК-чипах высокой плотности CytoScan™ HD Array оценено наличие хромосомных aberrаций гена и участков потери гетерозиготности в биопсийном опухолевом материале до лечения. Оценен статус метилирования промоторного региона исследуемого гена в опухолевой ткани.

2. Установлено, что частота хромосомных aberrаций в гене *BRCA1* составляет 55,7%, LOH - 31,4%, 40% пациентов имеют метилированный промотор. Анализ ассоциации исследуемых параметром с основными клинико-патологическими параметрами пациентов показал наличие статистически достоверных различий начального уровня экспрессии *BRCA1* в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ ($p=0,005$). Также показана связь CNA с гистологической формой опухоли и молекулярным подтипом опухоли. Со статусом метилирования ассоциировано лимфогенное метастазирование: при наличии метастазов в лимфоузлы частота метилирования промотора *BRCA1* статистически значимо выше по сравнению с группой пациентов с отсутствием метастазов (Fisher test, $p=0,008$).

3. Оценено влияние на экспрессию гена *BRCA1* хромосомных aberrаций, потери гетерозиготности и метилирования промотора. Каждый из исследуемых параметров достоверно влияет на экспрессию. Наличие aberrантного состояния гена связано с низким уровнем экспрессии (в случае делеции, LOH, метидирования), или с высокой экспрессией (при амплификации).

4. Показана предиктивная значимость экспрессии гена: высокий уровень сопряжен с объективным ответом на лечение в общей группе пациентов. Аналогичный результат представлен для CNA, явления потери гетерозиготности и метелирования промотора, во всех случаях наличия aberrантной составляющей в гене *BRCA1* сопряжено с хорошим ответом на лечение (Fisher test, $p=0,0005$; $p=0,02$; $p=0,03$).

5. Оценка прогностической значимости потери гетерозиготности в гене *BRCA1* показала, что с более высокими показателями безметастатической выживаемости коррелирует наличие LOH по сравнению с группой больных с нормальным состоянием гена (log-rank test $p=0,01$).

6. Был исследован вклад генов *NF-κB* и *PAPR1* в эффективность неoadъювантной химиотерапии и прогноз. Установлено, что амплификация гена *PAPR1* является независимым предиктивным и прогностическим маркером.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Afghahi, K. M. Timms, S. Vinayak, K. C. Jensen, A. W. Kurian, R. W. Carlson, P.-J. Chang, E. A. Schackmann, A.-R. Hartman, J. M. Ford. Tumor BRCA1 Reversion Mutation Arising During Neoadjuvant Platinum-Based Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer Is Associated with Therapy Resistance / A. Afghahi, K. M. Timms, S. Vinayak, K. C. Jensen, A. W. Kurian, R. W. Carlson, P.-J. Chang, E. A. Schackmann, A.-R. Hartman, J. M. Ford // *Clinical Cancer Research*.– 2017.– Vol. – P. clincanres. 2174.2016.
2. S. Alanee, S. Shah, R. Murali, R. Rau-Murthy, K. A. Schrader, K. Offit. Absence of loss of heterozygosity of BRCA1 in a renal tumor from a BRCA1 germline mutation carrier / S. Alanee, S. Shah, R. Murali, R. Rau-Murthy, K. A. Schrader, K. Offit // *Familial cancer*.– 2013.– Vol. 12, № 1. – P. 125–127.
3. M. W. Audeh, J. Carmichael, R. T. Penson, M. Friedlander, B. Powell, K. M. Bell-McGuinn, C. Scott, J. N. Weitzel, A. Oaknin, N. Loman. Oral poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial / M. W. Audeh, J. Carmichael, R. T. Penson, M. Friedlander, B. Powell, K. M. Bell-McGuinn, C. Scott, J. N. Weitzel, A. Oaknin, N. Loman // *The Lancet*.– 2010.– Vol. 376, № 9737. – P. 245–251.
4. Bhattacharyya, U. S. Ear, B. H. Koller, R. R. Weichselbaum, D. K. Bishop. The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of Rad51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin / A. Bhattacharyya, U. S. Ear, B. H. Koller, R. R. Weichselbaum, D. K. Bishop // *Journal of Biological Chemistry*.– 2000.– Vol. 275, № 31. – P. 23899–23903.
5. H. A. Burris III, J. Tibbitts, S. N. Holden, M. X. Sliwkowski, G. D. L. Phillips. Trastuzumab emtansine (T-DM1): a novel agent for targeting HER2+ breast cancer / H. A. Burris III, J. Tibbitts, S. N. Holden, M. X. Sliwkowski, G. D. L. Phillips // *Clinical breast cancer*.– 2011.– Vol. 11, № 5. – P. 275–282.
6. T. Byrski, T. Huzarski, R. Dent, J. Gronwald, D. Zuziak, C. Cybulski, J. Kladny, B. Gorski, J. Lubinski, S. Narod. Response to neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients / T. Byrski, T. Huzarski, R. Dent, J. Gronwald, D. Zuziak, C. Cybulski, J. Kladny, B. Gorski, J. Lubinski, S. Narod // *Breast cancer research and treatment*.– 2009.– Vol. 115, № 2. – P. 359–363.
7. T. Byrski, T. Huzarski, R. Dent, E. Marczyk, M. Jasiowka, J. Gronwald, J. Jakubowicz, C. Cybulski, R. Wisniowski, D. Godlewski. Pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients / T. Byrski, T. Huzarski, R. Dent, E.

- Marczyk, M. Jasiowka, J. Gronwald, J. Jakubowicz, C. Cybulski, R. Wisniowski, D. Godlewski // *Breast cancer research and treatment*.– 2014.– Vol. 147, № 2. – P. 401–405.
8. H. Cai, N. Kumar, M. Baudis. arrayMap: a reference resource for genomic copy number imbalances in human malignancies / H. Cai, N. Kumar, M. Baudis // *PLoS One*.– 2012.– Vol. 7, № 5. – P. e36944.
 9. F. Cardoso, A. Costa, L. Norton, E. Senkus, M. Aapro, F. Andre, C. Barrios, J. Bergh, L. Biganzoli, K. Blackwell. ESO–ESMO 2nd international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC2) / F. Cardoso, A. Costa, L. Norton, E. Senkus, M. Aapro, F. Andre, C. Barrios, J. Bergh, L. Biganzoli, K. Blackwell // *Annals of Oncology*.– 2014.– Vol. 25, № 10. – P. 1871–1888.
 10. L. Carey, E. Winer, G. Viale, D. Cameron, L. Gianni. Triple–negative breast cancer: disease entity or title of convenience? / L. Carey, E. Winer, G. Viale, D. Cameron, L. Gianni // *Nature reviews Clinical oncology*.– 2010.– Vol. 7, № 12. – P. 683.
 11. Y. Chen, C. Chen. DNA copy number variation and loss of heterozygosity in relation to recurrence of and survival from head and neck squamous cell carcinoma: a review / Y. Chen, C. Chen // *Head & neck*.– 2008.– Vol. 30, № 10. – P. 1361–1383.
 12. J. A. De Soto, X. Wang, Y. Tominaga, R.–H. Wang, L. Cao, W. Qiao, C. Li, X. Xu, A. P. Skoumbourdis, S. A. Prindiville. The inhibition and treatment of breast cancer with poly (ADP–ribose) polymerase (PARP–1) inhibitors / J. A. De Soto, X. Wang, Y. Tominaga, R.–H. Wang, L. Cao, W. Qiao, C. Li, X. Xu, A. P. Skoumbourdis, S. A. Prindiville // *International journal of biological sciences*.– 2006.– Vol. 2, № 4. – P. 179.
 13. W. Durkacz, O. Omidiji, D. A. Gray, S. Shall. (ADP–ribose) n participates in DNA excision repair / B. W. Durkacz, O. Omidiji, D. A. Gray, S. Shall // *Nature*.– 1980.– Vol. 283, № 5747. – P. 593.
 14. Egawa, K. Motomura, Y. Miyoshi, Y. Takamura, T. Taguchi, Y. Tamaki, H. Inaji, H. Koyama, S. Noguchi. Increased expression of BRCA1 mRNA predicts favorable response to anthracycline–containing chemotherapy in breast cancers / C. Egawa, K. Motomura, Y. Miyoshi, Y. Takamura, T. Taguchi, Y. Tamaki, H. Inaji, H. Koyama, S. Noguchi // *Breast cancer research and treatment*.– 2003.– Vol. 78, № 1. – P. 45–50.
 15. J. Fasano, F. Muggia. Breast cancer arising in a BRCA–mutated background: therapeutic implications from an animal model and drug development / J. Fasano, F. Muggia // *Annals of Oncology*.– 2009.– Vol. 20, № 4. – P. 609–614.
 16. J. L. Fleming, A. M. Dworkin, D. C. Allain, S. Fernandez, L. Wei, S. B. Peters, O. H. Iwenofu, K. Ridd, B. C. Bastian, A. E. Toland. Allele-specific imbalance mapping identifies HDAC9 as a candidate gene for cutaneous squamous cell carcinoma / J. L. Fleming, A. M.

- Dworkin, D. C. Allain, S. Fernandez, L. Wei, S. B. Peters, O. H. Iwenofu, K. Ridd, B. C. Bastian, A. E. Toland // *International Journal of Cancer*.– 2014.– Vol. 134, № 1. – P. 244–248.
17. G. Fountzilas, A. Athanassiades, T. Giannakakis, D. Bafaloukos, K. Karakousis, N. Dombros, P. Kosmidis, D. Skarlos. A phase II study of paclitaxel in advanced breast cancer resistant to anthracyclines / G. Fountzilas, A. Athanassiades, T. Giannakakis, D. Bafaloukos, K. Karakousis, N. Dombros, P. Kosmidis, D. Skarlos // *European Journal of Cancer*.– 1996.– Vol. 32, № 1. – P. 47–51.
18. T. Golan, T. Sella, E. M. O'Reilly, M. H. Katz, R. Epelbaum, D. P. Kelsen, A. Borgida, H. Maynard, H. Kindler, E. Friedmen. Overall survival and clinical characteristics of BRCA mutation carriers with stage I/II pancreatic cancer / T. Golan, T. Sella, E. M. O'Reilly, M. H. Katz, R. Epelbaum, D. P. Kelsen, A. Borgida, H. Maynard, H. Kindler, E. Friedmen // *British journal of cancer*.– 2017.– Vol. 116, № 6. – P. 697.
19. Goldhirsch, E. P. Winer, A. Coates, R. Gelber, M. Piccart–Gebhart, B. Thürlimann, H.–J. Senn, P. members, K. S. Albain, F. André. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013 / A. Goldhirsch, E. P. Winer, A. Coates, R. Gelber, M. Piccart–Gebhart, B. Thürlimann, H.–J. Senn, P. members, K. S. Albain, F. André // *Annals of Oncology*.– 2013.– Vol. 24, № 9. – P. 2206–2223.
20. T. V. Gorodnova, A. P. Sokolenko, A. O. Ivantsov, A. G. Iyevleva, E. N. Suspitsin, S. N. Aleksakhina, G. A. Yanus, A. V. Togo, S. Y. Maximov, E. N. Imyanitov. High response rates to neoadjuvant platinum–based therapy in ovarian cancer patients carrying germ–line BRCA mutation / T. V. Gorodnova, A. P. Sokolenko, A. O. Ivantsov, A. G. Iyevleva, E. N. Suspitsin, S. N. Aleksakhina, G. A. Yanus, A. V. Togo, S. Y. Maximov, E. N. Imyanitov // *Cancer letters*.– 2015.– Vol. 369, № 2. – P. 363–367.
21. K. Gudmundsdottir, A. Ashworth. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability / K. Gudmundsdottir, A. Ashworth // *Oncogene*.– 2006.– Vol. 25, № 43. – P. 5864.
22. G. Ha, A. Roth, J. Khattra, J. Ho, D. Yap, L. M. Prentice, N. Melnyk, A. McPherson, A. Bashashati, E. Laks. TITAN: inference of copy number architectures in clonal cell populations from tumor whole–genome sequence data / G. Ha, A. Roth, J. Khattra, J. Ho, D. Yap, L. M. Prentice, N. Melnyk, A. McPherson, A. Bashashati, E. Laks // *Genome research*.– 2014.– Vol. 24, № 11. – P. 1881–1893.
23. M. T. Harte, J. J. Gorski, K. I. Savage, J. W. Purcell, E. M. Barros, P. M. Burn, C. McFarlane, P. B. Mullan, R. D. Kennedy, N. D. Perkins. NF– κ B is a critical mediator of BRCA1–induced chemoresistance / M. T. Harte, J. J. Gorski, K. I. Savage, J. W. Purcell, E. M.

- Barros, P. M. Burn, C. McFarlane, P. B. Mullan, R. D. Kennedy, N. D. Perkins // *Oncogene*.– 2014.– Vol. 33, № 6. – P. 713.
24. J. Hayward, P. Carbone, J.-C. Heuson, S. Kumaoka, A. Segaloff, R. Rubens. Assessment of response to therapy in advanced breast cancer: a project of the Programme on Clinical Oncology of the International Union Against Cancer, Geneva, Switzerland / J. Hayward, P. Carbone, J.-C. Heuson, S. Kumaoka, A. Segaloff, R. Rubens // *European Journal of Cancer* (1965).– 1977.– Vol. 13, № 1. – P. 89–94.
25. S. C. Hedgepeth, M. I. Garcia, L. E. Wagner, A. M. Rodriguez, S. V. Chintapalli, R. R. Snyder, G. D. Hankins, B. R. Henderson, K. M. Brodie, D. I. Yule. The BRCA1 tumor suppressor binds to inositol 1, 4, 5–trisphosphate receptors to stimulate apoptotic calcium release / S. C. Hedgepeth, M. I. Garcia, L. E. Wagner, A. M. Rodriguez, S. V. Chintapalli, R. R. Snyder, G. D. Hankins, B. R. Henderson, K. M. Brodie, D. I. Yule // *Journal of Biological Chemistry*.– 2015.– Vol. 290, № 11. – P. 7304–7313.
26. T. Helleday, J. Lo, D. C. van Gent, B. P. Engelward. DNA double–strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment / T. Helleday, J. Lo, D. C. van Gent, B. P. Engelward // *DNA repair*.– 2007.– Vol. 6, № 7. – P. 923–935.
27. Z. Hu, C. Fan, D. S. Oh, J. Marron, X. He, B. F. Qaqish, C. Livasy, L. A. Carey, E. Reynolds, L. Dressler. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms / Z. Hu, C. Fan, D. S. Oh, J. Marron, X. He, B. F. Qaqish, C. Livasy, L. A. Carey, E. Reynolds, L. Dressler // *BMC Genomics*.– 2006.– Vol. 7, № 1. – P. 96.
28. N. Imyanitov, V. M. Moiseyenko. Molecular–based choice of cancer therapy: realities and expectations / E. N. Imyanitov, V. M. Moiseyenko // *Clinica chimica acta*.– 2007.– Vol. 379, № 1–2. – P. 1–13.
29. N. Imyanitov, V. M. Moiseyenko. Drug therapy for hereditary cancers / E. N. Imyanitov, V. M. Moiseyenko // *Hereditary cancer in clinical practice*.– 2011.– Vol. 9, № 1. – P. 5.
30. R. James, J. E. Quinn, P. B. Mullan, P. G. Johnston, D. P. Harkin. BRCA1, a potential predictive biomarker in the treatment of breast cancer / C. R. James, J. E. Quinn, P. B. Mullan, P. G. Johnston, D. P. Harkin // *The Oncologist*.– 2007.– Vol. 12, № 2. – P. 142–150.
31. N. Johnson, O. Fletcher, C. Palles, M. Rudd, E. Webb, G. Sellick, I. dos Santos Silva, V. McCormack, L. Gibson, A. Fraser. Counting potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility / N. Johnson, O. Fletcher, C. Palles, M. Rudd, E. Webb, G. Sellick, I. dos Santos Silva, V. McCormack, L. Gibson, A. Fraser // *Human molecular genetics*.– 2007.– Vol. 16, № 9. – P. 1051–1057.
32. L. Kadouri, A. Hubert, Y. Rotenberg, T. Hamburger, M. Sagi, C. Nechushtan, D. Abeliovich, T. Peretz. Cancer risks in carriers of the BRCA1/2 Ashkenazi founder mutations / L.

- Kadouri, A. Hubert, Y. Rotenberg, T. Hamburger, M. Sagi, C. Nechushtan, D. Abeliovich, T. Peretz // *Journal of medical genetics*.– 2007.– Vol. 44, № 7. – P. 467–471.
33. M. Kaufmann, G. von Minckwitz, E. P. Mamounas, D. Cameron, L. A. Carey, M. Cristofanilli, C. Denkert, W. Eiermann, M. Gnant, J. R. Harris. Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer / M. Kaufmann, G. von Minckwitz, E. P. Mamounas, D. Cameron, L. A. Carey, M. Cristofanilli, C. Denkert, W. Eiermann, M. Gnant, J. R. Harris // *Annals of surgical oncology*.– 2012.– Vol. 19, № 5. – P. 1508–1516.
34. G. Knudson. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma / A. G. Knudson // *Proceedings of the National Academy of Sciences*.– 1971.– Vol. 68, № 4. – P. 820–823.
35. S. Kommoss, P. Harter, J. Hauke, F. Heitz, A. Reuss, F. Marmé, A. Heimbach, K. Prieske, L. Richters, A. Burges. Incidence of germline mutations in risk genes including BRCA1/2 in consecutive ovarian cancer (OC) patients (AGO TR–1) / S. Kommoss, P. Harter, J. Hauke, F. Heitz, A. Reuss, F. Marmé, A. Heimbach, K. Prieske, L. Richters, A. Burges // *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*.– 2016.– Vol. 76, № 10. – P. P079.
36. M. Kriege, A. Jager, M. J. Hooning, E. Huijskens, J. Blom, C. H. van Deurzen, M. Bontenbal, J. M. Collee, M. B. Menke-Pluijmers, J. W. Martens. The efficacy of taxane chemotherapy for metastatic breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers / M. Kriege, A. Jager, M. J. Hooning, E. Huijskens, J. Blom, C. H. van Deurzen, M. Bontenbal, J. M. Collee, M. B. Menke-Pluijmers, J. W. Martens // *Cancer*.– 2012.– Vol. 118, № 4. – P. 899–907.
37. M. Kruitjer, J. Verweij, J. H. Schellens, J. Beijnen, L. Pronk, M. Bo, V. Lustig, H. van Tinteren, M. Mackay, W. T. B. Huinink. Docetaxel in 253 previously treated patients with progressive locally advanced or metastatic breast cancer: results of a compassionate use program in The Netherlands / C. M. Kruitjer, J. Verweij, J. H. Schellens, J. Beijnen, L. Pronk, M. Bo, V. Lustig, H. van Tinteren, M. Mackay, W. T. B. Huinink // *Anti-cancer drugs*.– 2000.– Vol. 11, № 4. – P. 249–255.
38. J. Kurebayashi, Y. Yamamoto, M. Kurosumi, S. Okubo, T. Nomura, K. Tanaka, H. Sonoo. Loss of BRCA1 expression may predict shorter time-to-progression in metastatic breast cancer patients treated with taxanes / J. Kurebayashi, Y. Yamamoto, M. Kurosumi, S. Okubo, T. Nomura, K. Tanaka, H. Sonoo // *Anticancer research*.– 2006.– Vol. 26, № 1B. – P. 695–701.
39. J. Lord, A. Ashworth. The DNA damage response and cancer therapy / C. J. Lord, A. Ashworth // *Nature*.– 2012.– Vol. 481, № 7381. – P. 287.
40. J. Markowska, J. Bar, R. Mądry, I. Słomska, M. Mardas, J. Grabowski. The expression of BRCA1, P53, KAI1, and Nm23 in ovaries of BRCA1 mutation carriers after prophylactic

- adnexectomy / J. Markowska, J. Bar, R. Mądry, I. Słomska, M. Mardas, J. Grabowski // Archives of gynecology and obstetrics.– 2013.– Vol. 288, № 4. – P. 839–844.
41. K. N. Maxwell, B. Wubbenhorst, B. M. Wenz, D. De Sloover, J. Pluta, L. Emery, A. Barrett, A. A. Kraya, I. N. Anastopoulos, S. Yu. BRCA locus-specific loss of heterozygosity in germline BRCA1 and BRCA2 carriers / K. N. Maxwell, B. Wubbenhorst, B. M. Wenz, D. De Sloover, J. Pluta, L. Emery, A. Barrett, A. A. Kraya, I. N. Anastopoulos, S. Yu // Nature communications.– 2017.– Vol. 8, № 1. – P. 319.
 42. Mazzotta, G. Partipilo, S. De Summa, F. Giotta, G. Simone, A. Mangia. Nuclear PARP1 expression and its prognostic significance in breast cancer patients / A. Mazzotta, G. Partipilo, S. De Summa, F. Giotta, G. Simone, A. Mangia // Tumor Biology.– 2016.– Vol. 37, № 5. – P. 6143–6153.
 43. T. McGrogan, B. Gilmartin, D. N. Carney, A. McCann. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer / B. T. McGrogan, B. Gilmartin, D. N. Carney, A. McCann // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Reviews on Cancer.– 2008.– Vol. 1785, № 2. – P. 96–132.
 44. J. A. Menendez, I. Mehmi, E. Atlas, R. Colomer, R. Lupu. Novel signaling molecules implicated in tumor-associated fatty acid synthase-dependent breast cancer cell proliferation and survival: Role of exogenous dietary fatty acids, p53–p21WAF1/CIP1, ERK1/2 MAPK, p27KIP1, BRCA1, and NF- κ B / J. A. Menendez, I. Mehmi, E. Atlas, R. Colomer, R. Lupu // International journal of oncology.– 2004.– Vol. 24, № 3. – P. 591–608.
 45. M. Mingo-Sion, P. M. Marietta, E. Koller, D. M. Wolf, C. L. Van Den Berg. Inhibition of JNK reduces G2/M transit independent of p53, leading to endoreduplication, decreased proliferation, and apoptosis in breast cancer cells / A. M. Mingo-Sion, P. M. Marietta, E. Koller, D. M. Wolf, C. L. Van Den Berg // Oncogene.– 2004.– Vol. 23, № 2. – P. 596–604.
 46. Morales-Cano, E. Calviño, V. Rubio, A. Herráez, P. Sancho, M. C. Tejedor, J. C. Díez. Apoptosis induced by paclitaxel via Bcl-2, Bax and caspases 3 and 9 activation in NB4 human leukaemia cells is not modulated by ERK inhibition / D. Morales-Cano, E. Calviño, V. Rubio, A. Herráez, P. Sancho, M. C. Tejedor, J. C. Díez // Experimental and Toxicologic Pathology.– 2013.– Vol. 65, № 7. – P. 1101–1108.
 47. S. W. Morrical. DNA-pairing and annealing processes in homologous recombination and homology-directed repair / S. W. Morrical // Cold Spring Harbor perspectives in biology.– 2015.– Vol. 7, № 2. – P. a016444.
 48. M. E. Moynahan, T. Y. Cui, M. Jasin. Homology-directed dna repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation / M. E. Moynahan, T. Y. Cui, M. Jasin // Cancer research.– 2001.– Vol. 61, № 12. – P. 4842–4850.

49. M. E. Moynahan, M. Jasin. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis / M. E. Moynahan, M. Jasin // *Nature reviews Molecular cell biology*.– 2010.– Vol. 11, № 3. – P. 196.
50. P. B. Mullan, J. E. Quinn, P. M. Gilmore, S. McWilliams, H. Andrews, C. Gervin, N. McCabe, S. McKenna, P. White, S. Young-Han. BRCA1 and GADD45 mediated G2/M cell cycle arrest in response to antimicrotubule agents / P. B. Mullan, J. E. Quinn, P. M. Gilmore, S. McWilliams, H. Andrews, C. Gervin, N. McCabe, S. McKenna, P. White, S. Young-Han // *Oncogene*.– 2001.– Vol. 20, № 43. – P. 6123.
51. H. Nomura, F. Kataoka, D. Aoki, H. Jinno, Y. Kitagawa, Y. Sato, C. Womack, H. Wombwell, D. Hodgson, M. O'Connor. Expression of potential biomarkers associated with homologous recombination repair in patients with ovarian or triple-negative breast cancer / H. Nomura, F. Kataoka, D. Aoki, H. Jinno, Y. Kitagawa, Y. Sato, C. Womack, H. Wombwell, D. Hodgson, M. O'Connor // *Cancer Biomarkers*.– 2016.– Vol. 16, № 1. – P. 145–152.
52. K. Okudela, Y. Tateishi, S. Umeda, H. Mitsui, T. Suzuki, Y. Saito, T. Woo, M. Tajiri, M. Masuda, Y. Miyagi. Allelic Imbalance in the miR-31 Host Gene Locus in Lung Cancer–Its Potential Role in Carcinogenesis / K. Okudela, Y. Tateishi, S. Umeda, H. Mitsui, T. Suzuki, Y. Saito, T. Woo, M. Tajiri, M. Masuda, Y. Miyagi // *PLoS One*.– 2014.– Vol. 9, № 6. – P. e100581.
53. Orsetti, F. Courjal, M. Cuny, C. Rodriguez, C. Theillet. 17q21-q25 aberrations in breast cancer: combined allelotyping and CGH analysis reveals 5 regions of allelic imbalance among which two correspond to DNA amplification / B. Orsetti, F. Courjal, M. Cuny, C. Rodriguez, C. Theillet // *Oncogene*.– 1999.– Vol. 18, № 46. – P. 6262–6270.
54. I. Palmero, B. Alemar, L. Schöler-Faccini, P. Hainaut, C. A. Moreira-Filho, I. P. Ewald, P. K. d. Santos, P. L. I. Ribeiro, C. B. d. Oliveira Netto, F. L. C. Kelm. Screening for germline BRCA1, BRCA2, TP53 and CHEK2 mutations in families at-risk for hereditary breast cancer identified in a population-based study from Southern Brazil / E. I. Palmero, B. Alemar, L. Schöler-Faccini, P. Hainaut, C. A. Moreira-Filho, I. P. Ewald, P. K. d. Santos, P. L. I. Ribeiro, C. B. d. Oliveira Netto, F. L. C. Kelm // *Genetics and molecular biology*.– 2016.– Vol. AHEAD. – P. 0–0.
55. J. S. Parker, M. Mullins, M. C. Cheang, S. Leung, D. Voduc, T. Vickery, S. Davies, C. Fauron, X. He, Z. Hu. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes / J. S. Parker, M. Mullins, M. C. Cheang, S. Leung, D. Voduc, T. Vickery, S. Davies, C. Fauron, X. He, Z. Hu // *Journal of Clinical Oncology*.– 2009.– Vol. 27, № 8. – P. 1160.
56. K. P. Pennington, T. Walsh, M. I. Harrell, M. K. Lee, C. C. Pennil, M. H. Rendi, A. Thornton, B. M. Norquist, S. Casadei, A. S. Nord. Germline and somatic mutations in

- homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas / K. P. Pennington, T. Walsh, M. I. Harrell, M. K. Lee, C. C. Pennil, M. H. Rendi, A. Thornton, B. M. Norquist, S. Casadei, A. S. Nord // *Clinical Cancer Research*.– 2014.– Vol. 20, № 3. – P. 764–775.
57. M. Perou, T. Sørlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen. Molecular portraits of human breast tumours / C. M. Perou, T. Sørlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen // *Nature*.– 2000.– Vol. 406, № 6797. – P. 747–752.
58. M. W. Pfaffl. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR / M. W. Pfaffl // *Nucleic acids research*.– 2001.– Vol. 29, № 9. – P. e45–e45.
59. K. Polyak. Heterogeneity in breast cancer / K. Polyak // *The Journal of clinical investigation*.– 2011.– Vol. 121, № 10. – P. 3786–3788.
60. R. Prakash, Y. Zhang, W. Feng, M. Jasin. Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins / R. Prakash, Y. Zhang, W. Feng, M. Jasin // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*.– 2015.– Vol. 7, № 4. – P. a016600.
61. Prat, C. M. Perou. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer / A. Prat, C. M. Perou // *Molecular oncology*.– 2011.– Vol. 5, № 1. – P. 5–23.
62. M. C. Prosperi, S. L. Ingham, A. Howell, F. Lalloo, I. E. Buchan, D. G. Evans. Can multiple SNP testing in BRCA2 and BRCA1 female carriers be used to improve risk prediction models in conjunction with clinical assessment? / M. C. Prosperi, S. L. Ingham, A. Howell, F. Lalloo, I. E. Buchan, D. G. Evans // *BMC medical informatics and decision making*.– 2014.– Vol. 14, № 1. – P. 87.
63. J. E. Quinn, C. R. James, G. E. Stewart, J. M. Mulligan, P. White, G. K. Chang, P. B. Mullan, P. G. Johnston, R. H. Wilson, D. P. Harkin. BRCA1 mRNA expression levels predict for overall survival in ovarian cancer after chemotherapy / J. E. Quinn, C. R. James, G. E. Stewart, J. M. Mulligan, P. White, G. K. Chang, P. B. Mullan, P. G. Johnston, R. H. Wilson, D. P. Harkin // *Clinical Cancer Research*.– 2007.– Vol. 13, № 24. – P. 7413–7420.
64. J. E. Quinn, R. D. Kennedy, P. B. Mullan, P. M. Gilmore, M. Carty, P. G. Johnston, D. P. Harkin. BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis / J. E. Quinn, R. D. Kennedy, P. B. Mullan, P. M. Gilmore, M. Carty, P. G. Johnston, D. P. Harkin // *Cancer research*.– 2003.– Vol. 63, № 19. – P. 6221–6228.
65. T. R. Rebbeck, N. Mitra, F. Wan, O. M. Sinilnikova, S. Healey, L. McGuffog, S. Mazoyer, G. Chenevix-Trench, D. F. Easton, A. C. Antoniou. Association of type and location of BRCA1 and BRCA2 mutations with risk of breast and ovarian cancer / T. R. Rebbeck, N.

- Mitra, F. Wan, O. M. Sinilnikova, S. Healey, L. McGuffog, S. Mazoyer, G. Chenevix-Trench, D. F. Easton, A. C. Antoniou // *Jama*.– 2015.– Vol. 313, № 13. – P. 1347–1361.
66. Rojo, J. Garcia-Parra, S. Zazo, I. Tusquets, J. Ferrer-Lozano, S. Menendez, P. Eroles, C. Chamizo, S. Servitja, N. Ramirez-Merino. Nuclear PARP-1 protein overexpression is associated with poor overall survival in early breast cancer / F. Rojo, J. Garcia-Parra, S. Zazo, I. Tusquets, J. Ferrer-Lozano, S. Menendez, P. Eroles, C. Chamizo, S. Servitja, N. Ramirez-Merino // *Annals of Oncology*.– 2011.– Vol. 23, № 5. – P. 1156–1164.
67. M. Rouleau, A. Patel, M. J. Hendzel, S. H. Kaufmann, G. G. Poirier. PARP inhibition: PARP1 and beyond / M. Rouleau, A. Patel, M. J. Hendzel, S. H. Kaufmann, G. G. Poirier // *Nature Reviews Cancer*.– 2010.– Vol. 10, № 4. – P. 293.
68. R. Rouzier, J.-M. Extra, J. Klijanienko, M.-C. Falco, B. Asselain, A. Vincent-Salomon, P. Vielh, E. Boursstyn. Incidence and prognostic significance of complete axillary downstaging after primary chemotherapy in breast cancer patients with T1 to T3 tumors and cytologically proven axillary metastatic lymph nodes / R. Rouzier, J.-M. Extra, J. Klijanienko, M.-C. Falco, B. Asselain, A. Vincent-Salomon, P. Vielh, E. Boursstyn // *Journal of Clinical Oncology*.– 2002.– Vol. 20, № 5. – P. 1304–1310.
69. R. Roy, J. Chun, S. N. Powell. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection / R. Roy, J. Chun, S. N. Powell // *Nature Reviews Cancer*.– 2012.– Vol. 12, № 1. – P. 68–78.
70. M. Saito, A. Okamoto, T. Kohno, S. Takakura, H. Shinozaki, S. Isonishi, T. Yasuhara, T. Yoshimura, Y. Ohtake, K. Ochiai. Allelic imbalance and mutations of the PTEN gene in ovarian cancer / M. Saito, A. Okamoto, T. Kohno, S. Takakura, H. Shinozaki, S. Isonishi, T. Yasuhara, T. Yoshimura, Y. Ohtake, K. Ochiai // *International Journal of Cancer*.– 2000.– Vol. 85, № 2. – P. 160–165.
71. Sau, R. Lau, M. A. Cabrita, E. Nolan, P. A. Crooks, J. E. Visvader, M. C. Pratt. Persistent activation of NF- κ B in BRCA1-deficient mammary progenitors drives aberrant proliferation and accumulation of DNA damage / A. Sau, R. Lau, M. A. Cabrita, E. Nolan, P. A. Crooks, J. E. Visvader, M. C. Pratt // *Cell Stem Cell*.– 2016.– Vol. 19, № 1. – P. 52–65.
72. S. L. Sawyer, L. Tian, M. Kähkönen, J. Schwartzentruber, M. Kircher, J. Majewski, D. A. Dymant, A. M. Innes, K. M. Boycott, L. A. Moreau. Biallelic mutations in BRCA1 cause a new Fanconi anemia subtype / S. L. Sawyer, L. Tian, M. Kähkönen, J. Schwartzentruber, M. Kircher, J. Majewski, D. A. Dymant, A. M. Innes, K. M. Boycott, L. A. Moreau // *Cancer discovery*.– 2015.– Vol. 5, № 2. – P. 135–142.

73. F. Schwartz, G. N. Hortobagyi. Proceedings of the consensus conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania / G. F. Schwartz, G. N. Hortobagyi // *The Breast Journal*.– 2004.– Vol. 10, № 4. – P. 273–294.
74. R. Scully, J. Chen, A. Plug, Y. Xiao, D. Weaver, J. Feunteun, T. Ashley, D. M. Livingston. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells / R. Scully, J. Chen, A. Plug, Y. Xiao, D. Weaver, J. Feunteun, T. Ashley, D. M. Livingston // *Cell*.– 1997.– Vol. 88, № 2. – P. 265–275.
75. Shikeeva, T. Kekeeva, L. Zavalishina, I. Andreeva, G. Frank. [Allelic imbalance in patients with non–small cell lung cancer] / A. Shikeeva, T. Kekeeva, L. Zavalishina, I. Andreeva, G. Frank // *Arkhiv patologii*.– 2012.– Vol. 75, № 2. – P. 3–8.
76. J. M. Silva, J. Silva, A. Sanchez, J. M. Garcia, G. Dominguez, M. Provencio, L. Sanfrutos, E. Jareño, A. Colas, P. España. Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease–free survival / J. M. Silva, J. Silva, A. Sanchez, J. M. Garcia, G. Dominguez, M. Provencio, L. Sanfrutos, E. Jareño, A. Colas, P. España // *Clinical Cancer Research*.– 2002.– Vol. 8, № 12. – P. 3761–3766.
77. J. Simard, P. Tonin, F. Durocher, K. Morgan, J. Rommens, S. Gingras, C. Samson, J.-F. Leblanc, C. Belanger, F. Dion. Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families / J. Simard, P. Tonin, F. Durocher, K. Morgan, J. Rommens, S. Gingras, C. Samson, J.-F. Leblanc, C. Belanger, F. Dion // *Nature genetics*.– 1994.– Vol. 8, № 4. – P. 392–398.
78. Slamon, W. Eiermann, N. Robert, T. Pienkowski, M. Martin, M. Press, J. Mackey, J. Glaspy, A. Chan, M. Pawlicki. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer / D. Slamon, W. Eiermann, N. Robert, T. Pienkowski, M. Martin, M. Press, J. Mackey, J. Glaspy, A. Chan, M. Pawlicki // *New England Journal of Medicine*.– 2011.– Vol. 365, № 14. – P. 1273–1283.
79. C. Smith, S. D. Heys, A. W. Hutcheon, I. D. Miller, S. Payne, F. J. Gilbert, A. K. Ah-See, O. Eremin, L. G. Walker, T. K. Sarkar. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: significantly enhanced response with docetaxel / I. C. Smith, S. D. Heys, A. W. Hutcheon, I. D. Miller, S. Payne, F. J. Gilbert, A. K. Ah-See, O. Eremin, L. G. Walker, T. K. Sarkar // *Journal of Clinical Oncology*.– 2002.– Vol. 20, № 6. – P. 1456–1466.
80. Sotiriou, L. Pusztai. Gene-expression signatures in breast cancer / C. Sotiriou, L. Pusztai // *New England Journal of Medicine*.– 2009.– Vol. 360, № 8. – P. 790–800.
81. J. A. Sparano, F. Zhao, S. Martino, J. A. Ligibel, E. A. Perez, T. Saphner, A. C. Wolff, G. W. Sledge Jr, W. C. Wood, N. E. Davidson. Long-term follow-up of the E1199 phase III trial evaluating the role of taxane and schedule in operable breast cancer / J. A. Sparano, F. Zhao, S.

- Martino, J. A. Ligibel, E. A. Perez, T. Saphner, A. C. Wolff, G. W. Sledge Jr, W. C. Wood, N. E. Davidson // *Journal of Clinical Oncology*.– 2015.– Vol. 33, № 21. – P. 2353.
82. M. Swisher, K. K. Lin, A. M. Oza, C. L. Scott, H. Giordano, J. Sun, G. E. Konecny, R. L. Coleman, A. V. Tinker, D. M. O'Malley. Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial / E. M. Swisher, K. K. Lin, A. M. Oza, C. L. Scott, H. Giordano, J. Sun, G. E. Konecny, R. L. Coleman, A. V. Tinker, D. M. O'Malley // *The lancet oncology*.– 2017.– Vol. 18, № 1. – P. 75–87.
83. Tamura. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer / G. Tamura // *World journal of gastroenterology: WJG*.– 2006.– Vol. 12, № 2. – P. 192–198.
84. S. Tan, C. Rothermundt, K. Thomas, E. Bancroft, R. Eeles, S. Shanley, A. Ardern-Jones, A. Norman, S. B. Kaye, M. E. Gore. “BRCAness” syndrome in ovarian cancer: a case–control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations / D. S. Tan, C. Rothermundt, K. Thomas, E. Bancroft, R. Eeles, S. Shanley, A. Ardern-Jones, A. Norman, S. B. Kaye, M. E. Gore // *Journal of Clinical Oncology*.– 2008.– Vol. 26, № 34. – P. 5530–5536.
85. V. Tarasova, T. N. Nayakshina, S. K. Degtyarev. Substrate specificity of new methyl-directed DNA endonuclease Glal / G. V. Tarasova, T. N. Nayakshina, S. K. Degtyarev // *BMC molecular biology*.– 2008.– Vol. 9, № 1. – P. 7.
86. M. L. Telli, J. Hellyer, W. Audeh, K. C. Jensen, S. Bose, K. M. Timms, A. Gutin, V. Abkevich, R. N. Peterson, C. Neff. Homologous recombination deficiency (HRD) status predicts response to standard neoadjuvant chemotherapy in patients with triple-negative or BRCA1/2 mutation-associated breast cancer / M. L. Telli, J. Hellyer, W. Audeh, K. C. Jensen, S. Bose, K. M. Timms, A. Gutin, V. Abkevich, R. N. Peterson, C. Neff // *Breast cancer research and treatment*.– 2018.– Vol. 168, № 3. – P. 625–630.
87. M. L. Telli, K. Timms, J. E. Reid, C. Neff, V. Abkevich, A. Gutin, Z. Sangale, D. Illiev, J. T. Jones, B. Hennessy (2015). Combined Homologous Recombination Deficiency (HRD) scores and response to neoadjuvant platinum-based chemotherapy in triple-negative and/or BRCA1/2 mutation-associated breast cancer, American Society of Clinical Oncology.
88. M. L. Telli, K. M. Timms, J. Reid, B. Hennessy, G. B. Mills, K. C. Jensen, Z. Szallasi, W. T. Barry, E. P. Winer, N. M. Tung. Homologous recombination deficiency (HRD) score predicts response to platinum-containing neoadjuvant chemotherapy in patients with triple-negative breast cancer / M. L. Telli, K. M. Timms, J. Reid, B. Hennessy, G. B. Mills, K. C. Jensen, Z. Szallasi, W. T. Barry, E. P. Winer, N. M. Tung // *Clinical Cancer Research*.– 2016.

89. Theillet (2010). What do we learn from HER2–positive breast cancer genomic profiles?, BioMed Central.
90. F. Thorn, C. Oshiro, S. Marsh, T. Hernandez-Boussard, H. McLeod, T. E. Klein, R. B. Altman. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects / C. F. Thorn, C. Oshiro, S. Marsh, T. Hernandez-Boussard, H. McLeod, T. E. Klein, R. B. Altman // Pharmacogenetics and Genomics.– 2011.– Vol. 21, № 7. – P. 440.
91. G. Tiezzi, J. M. Andrade, A. Ribeiro-Silva, F. E. Zola, H. R. Marana, M. G. Tiezzi. HER–2, p53, p21 and hormonal receptors proteins expression as predictive factors of response and prognosis in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel plus epirubicin combination / D. G. Tiezzi, J. M. Andrade, A. Ribeiro-Silva, F. E. Zola, H. R. Marana, M. G. Tiezzi // BMC Cancer.– 2007.– Vol. 7, № 1. – P. 36.
92. N. Tsavaris, C. Kosmas, M. Vadiaka, P. Kanelopoulos, D. Boulamatsis. Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes / N. Tsavaris, C. Kosmas, M. Vadiaka, P. Kanelopoulos, D. Boulamatsis // British journal of cancer.– 2002.– Vol. 87, № 1. – P. 21.
93. Tsibulak, G. Shivalingaiah, S. Wenzel, S. Sprung, S. Lax, C. Marth, H. Fiegl, A. G. Zeimet (2018). Clinical impact of BRCA1 and BRCA2 mRNA expression in ovarian cancer, American Society of Clinical Oncology.
94. Q. Wang, H. Zhang, R. Fishel, M. I. Greene. BRCA1 and cell signaling / Q. Wang, H. Zhang, R. Fishel, M. I. Greene // Oncogene.– 2000.– Vol. 19, № 53. – P. 6152.
95. T. Watanabe, T.-T. Wu, P. J. Catalano, T. Ueki, R. Satriano, D. G. Haller, A. B. Benson, S. R. Hamilton. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer / T. Watanabe, T.-T. Wu, P. J. Catalano, T. Ueki, R. Satriano, D. G. Haller, A. B. Benson, S. R. Hamilton // New England Journal of Medicine.– 2001.– Vol. 344, № 16. – P. 1196–1206.
96. M. K. Weil, A. Chen. PARP inhibitor treatment in ovarian and breast cancer / M. K. Weil, A. Chen // Current problems in cancer.– 2011.– Vol. 35, № 1. – P. 7.
97. N. Wolmark, J. Wang, E. Mamounas, J. Bryant, B. Fisher. Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B–18 / N. Wolmark, J. Wang, E. Mamounas, J. Bryant, B. Fisher // MONOGRAPHS–NATIONAL CANCER INSTITUTE.– 2001.– Vol. 30, № – P. 96–102.
98. T. Wu, J. G. Kral. The NF- κ B/I κ B signaling system: a molecular target in breast cancer therapy / J. T. Wu, J. G. Kral // Journal of Surgical Research.– 2005.– Vol. 123, № 1. – P. 158–169.
99. P. J. Wysocki, K. Korski, K. Lamperska, J. Zaluski, A. Mackiewicz. Primary resistance to docetaxel-based chemotherapy in metastatic breast cancer patients correlates with a high

- frequency of BRCA1 mutations / P. J. Wysocki, K. Korski, K. Lamperska, J. Zaluski, A. Mackiewicz // *Medical Science Monitor.*– 2008.– Vol. 14, № 7. – P. SC7–SC10.
100. X. Xu, Z. Weaver, S. P. Linke, C. Li, J. Gotay, X.-W. Wang, C. C. Harris, T. Ried, C.-X. Deng. Centrosome amplification and a defective G2–M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells / X. Xu, Z. Weaver, S. P. Linke, C. Li, J. Gotay, X.-W. Wang, C. C. Harris, T. Ried, C.-X. Deng // *Molecular cell.*– 1999.– Vol. 3, № 3. – P. 389–395.
101. M. Yanagawa, M. Tatsumi, H. Miyata, E. Morii, N. Tomiyama, T. Watabe, K. Isohashi, H. Kato, E. Shimosegawa, M. Yamasaki. Evaluation of response to neoadjuvant chemotherapy for esophageal cancer: PET response criteria in solid tumors versus response evaluation criteria in solid tumors / M. Yanagawa, M. Tatsumi, H. Miyata, E. Morii, N. Tomiyama, T. Watabe, K. Isohashi, H. Kato, E. Shimosegawa, M. Yamasaki // *Journal of Nuclear Medicine.*– 2012.– Vol. 53, № 6. – P. 872.
102. Zhang, Z. Ma, A. Treszezamsky, S. N. Powell. MDC1 interacts with Rad51 and facilitates homologous recombination / J. Zhang, Z. Ma, A. Treszezamsky, S. N. Powell // *Nature structural & molecular biology.*– 2005.– Vol. 12, № 10. – P. 902.
103. Zhang, X. Long. Association of BRCA1 promoter methylation with sporadic breast cancers: Evidence from 40 studies / L. Zhang, X. Long // *Scientific reports.*– 2015.– Vol. 5, № – P. 17869.
104. Q. Zhong, H.-L. Peng, X. Zhao, L. Zhang, W.-T. Hwang. Effects of BRCA1-and BRCA2-related mutations on ovarian and breast cancer survival: a meta-analysis / Q. Zhong, H.-L. Peng, X. Zhao, L. Zhang, W.-T. Hwang // *Clinical Cancer Research.*– 2014.– Vol. – P. clincanres. 1816.2014.
105. Б. Альбертс, Д. Брей, К. Хопкин, А. Джонсон, Д. Льюис, М. Рэфф, К. Робертс, П. Уолтер. Основы молекулярной биологии клетки / Б. Альбертс, Д. Брей, К. Хопкин, А. Джонсон, Д. Льюис, М. Рэфф, К. Робертс, П. Уолтер // М.: БИН ОМ. Лаборатория знаний.– 2015.
106. О. Д. Брагина, Е. М. Слонимская, М. В. Завьялова, Н. Телегина, В. М. Перельмутер, Н. А. Тарабановская, А. В. Дорошенко. Предсказательное значение ряда молекулярных параметров у больных базальноподобным трипл-негативным раком молочной железы / О. Д. Брагина, Е. М. Слонимская, М. В. Завьялова, Н. Телегина, В. М. Перельмутер, Н. А. Тарабановская, А. В. Дорошенко // *СИБИРСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ.*– 2014.– Т. 3.
107. И. Гафтон, Е. Имянитов, В. Семиглазов, Д. Мацко, Г. Гафтон, Ю. Семилетова, А. Иевлева, А. Михнин, В. Лемехов. Экспрессия гена BRCA1 при нейроэндокринных

- опухолях желудочно-кишечного тракта / И. Гафтон, Е. Имянитов, В. Семиглазов, Д. Мацко, Г. Гафтон, Ю. Семилетова, А. Иевлева, А. Михнин, В. Лемехов // СИБИРСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ.– 2014.– Т. 4.
108. М. Давыдов, Е. Аксель. Заболеваемость и смертность от рака молочной железы. Большая конференция RUSSCO рак молочной железы / М. Давыдов, Е. Аксель // Москва.– 2014
109. Е. Загрекова, А. Мещеряков. Лекарственное лечение рака молочной железы / Е. Загрекова, А. Мещеряков // Русский медицинский журнал.– 2002.– Т. 10, № 14. – С. 605–608.
110. Е. Имянитов. Наследственный рак молочной железы / Е. Имянитов // Практическая онкология.– 2010.– Т. 11, № 4. – С. 258–266.
111. Е. Кулигина. Эпидемиологические и молекулярные аспекты рака молочной железы / Е. Кулигина // Практическая онкология.– 2010.– Т. 11, № 4. – С. 203–216.
112. Н. В. Литвяков, Н. В. Чердынцева, М. М. Цыганов, Е. В. Денисов, М. К. Мерзлякова, Е. Ю. Гарбуков, М. В. Завьялова, Е. М. Слонимская. Ассоциация генетического полиморфизма с изменением экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии / Н. В. Литвяков, Н. В. Чердынцева, М. М. Цыганов, Е. В. Денисов, М. К. Мерзлякова, Е. Ю. Гарбуков, М. В. Завьялова, Е. М. Слонимская // Медицинская генетика.– 2011.– Vol. 10, № 10. – С. 37–43.
113. И. Поддубная. Достижения современной химиотерапии / И. Поддубная // Современная онкология.– 2003.– Т. 5, № 2. – С. 47–58.
114. В. Семиглазов, Р. Донских, В. Семиглазов. Неоадъювантное и адъювантное лечение рака молочной железы (значение таксанов) / В. Семиглазов, Р. Донских, В. Семиглазов // Здоров'я України.– 2009.– Т. 1, № 4.
115. В. Семиглазов, В. Семиглазов, Г. Дашян, Т. Семиглазова, А. Манихас. Стратегия лечения рака молочной железы, основанная на выделении биологических подтипов / В. Семиглазов, В. Семиглазов, Г. Дашян, Т. Семиглазова, А. Манихас // Врач. – 2011. – Т. 12. – С. 28–34.
116. В. Семиглазов, В. Семиглазов, Р. Палтуев, Г. Дашян, Т. Семиглазова, П. Криворотько, А. Комяхов, Ж. Брянцева, К. Николаев, Д. Щедрин. Неоадъювантное лечение рака молочной железы / В. Семиглазов, В. Семиглазов, Р. Палтуев, Г. Дашян, Т. Семиглазова, П. Криворотько, А. Комяхов, Ж. Брянцева, К. Николаев, Д. Щедрин // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2014. – Т. 2. – С. 30–36.

117. В. Ф. Семиглазов, В. В. Семиглазов, А. Е. Клетсель (2008). Неоадьювантное и адьювантное лечение рака молочной железы, МИА.
118. Т. Семиглазова, В. Семиглазов, Л. Филатова, П. Криворотько, В. Клименко, В. Иванов, С. Новиков, М. Гершанович, Е. Имянитов, В. Семиглазов. Значение молекулярных маркеров при выборе неоадьювантной химиотерапии местнораспространенного рака молочной железы / Т. Семиглазова, В. Семиглазов, Л. Филатова, П. Криворотько, В. Клименко, В. Иванов, С. Новиков, М. Гершанович, Е. Имянитов, В. Семиглазов // Фарматека – 2013. – Т. 270, № 17. – С. 57–64.
119. Н. Е. Торопова, Е. В. Закамова, Ю. Ю. Тетерина, С. В. Козлов, Н. В. Тимофеева, Г. П. Морошкина, С. Г. Нетелева, Е. Н. Липатова, Л. В. Трухова, Е. В. Фролова. Молекулярно–генетические исследования в практике онкологической клиники / Н. Е. Торопова, Е. В. Закамова, Ю. Ю. Тетерина, С. В. Козлов, Н. В. Тимофеева, Г. П. Морошкина, С. Г. Нетелева, Е. Н. Липатова, Л. В. Трухова, Е. В. Фролова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2015. – Т. 17, № 2–3.

Разрешение

Я, Стегний Владимир Николаевич, разрешаю Певзнер А. М.
разместить текст ВР в сокращенном виде с изъятием некоторых
разделов.

Руководитель ООП

Зав. каф. цитологии и генетики

Д-р биол. наук, профессор


В. Н. Стегний

«11» июня 2019



Поиск заимствований в научных текстах^β

[\(/index.php/ru/\)](/index.php/ru/) [\(/index.php/en/\)](/index.php/en/)

Введите текст:

...или загрузите файл:

Файл не выбран...

Выбрать файл...

Укажите год публикации:

2019 ▼

Выберите коллекции

Все

Рефераты

Авторефераты

Иностранные конференции

PubMed

Википедия

Российские конференции

Иностранные журналы

Российские журналы

Энциклопедии

Англоязычная википедия

Анализировать

 Проверить по расширенному списку коллекций системы Руконтекст (<http://text.rucont.ru/like>)

Год публикации: 2019.

Оценка оригинальности документа - 88.32%

Процент условно корректных заимствований - 0.0%

Процент некорректных заимствований - 11.68%

Просмотр заимствований в документе

Время выполнения: 14 с.

Документы из базы

Источники заимствования

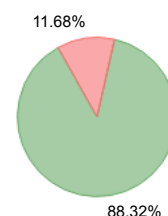
1. Микроматричный анализ аномалий числа копий ДНК опухоли молочной железы: : связь с эффектом неoadъювантной химиотерапии
 (<http://cyberleninka.ru/article/n/mikromatrichnyy-analiz-anomaliy-chisla-kopiy-dnk-opuholi-molochnoy-zhelezy-svyaz-s-effektom-neoadyuvantnoy-himioterapii>)

Авторы: Литвяков Николай Васильевич, Цыганов М. М., Чердынцева Надежда Викторовна.

Год публикации: 2014. Тип публикации: статья научного журнала.

<http://cyberleninka.ru/article/n/mikromatrichnyy-analiz-anomaliy-chisla-kopiy-dnk-opuholi-molochnoy-zhelezy-svyaz-s-effektom-neoadyuvantnoy-himioterapii>
<http://cyberleninka.ru/article/n/mikromatrichnyy-analiz-anomaliy-chisla-kopiy-dnk-opuholi-molochnoy-zhelezy-svyaz-s-effektom-neoadyuvantnoy-himioterapii>

Показать заимствования (20)


 В списке литературы
 Источники
 Заимствования

4.48%

2. Регуляция экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли молочной железы при проведении неoadъювантной химиотерапии (<http://vak2.ed.gov.ru/idcUploadAutoref/renderFile/171778>)

Авторы: Литвяков Николай Васильевич.

Год публикации: 2014. Тип публикации: автореферат диссертации.

<http://vak2.ed.gov.ru/idcUploadAutoref/renderFile/171778>

(<http://vak2.ed.gov.ru/idcUploadAutoref/renderFile/171778>)

[Показать заимствования \(19\)](#)

3.97%

3. Аберрации числа копий ДНК в лимфоцитах крови лиц, подвергавшихся профессиональному облучению, как потенциальный маркер их высокой радиочувствительности (<http://cyberleninka.ru/article/n/aberratsii-chisla-kopiy-dnk-v-limfotsitah-krovi-lits-podvergavshihsya-professionalnomu-oblucheniyu-kak-potentsialnyy-markyor-ih-vysokoy>)

Авторы: Литвяков Николай Васильевич, Халюзова Мария Вячеславовна, Тахауов Равиль Манихович.

Год публикации: 2015. Тип публикации: статья научного журнала.

<http://cyberleninka.ru/article/n/aberratsii-chisla-kopiy-dnk-v-limfotsitah-krovi-lits-podvergavshihsya-professionalnomu-oblucheniyu-kak-potentsialnyy-markyor-ih-vysokoy>

(<http://cyberleninka.ru/article/n/aberratsii-chisla-kopiy-dnk-v-limfotsitah-krovi-lits-podvergavshihsya-professionalnomu-oblucheniyu-kak-potentsialnyy-markyor-ih-vysokoy>)

[Показать заимствования \(16\)](#)

3.39%

4. Градиентный феномен экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли молочной железы при проведении неoadъювантной химиотерапии: связь с прогрессированием заболевания (<http://cyberleninka.ru/article/n/gradientnyy-fenomen-ekspressii-genov-mnozhestvennoy-lekarstvennoy-ustoychivosti-v-opuholi-molochnoy-zhelezy-pri-provedenii>)

Авторы: Литвяков Николай Васильевич.

Год публикации: 2013. Тип публикации: статья научного журнала.

<http://cyberleninka.ru/article/n/gradientnyy-fenomen-ekspressii-genov-mnozhestvennoy-lekarstvennoy-ustoychivosti-v-opuholi-molochnoy-zhelezy-pri-provedenii>

(<http://cyberleninka.ru/article/n/gradientnyy-fenomen-ekspressii-genov-mnozhestvennoy-lekarstvennoy-ustoychivosti-v-opuholi-molochnoy-zhelezy-pri-provedenii>)

[Показать заимствования \(12\)](#)

3.16%

5. Комбинированное лечение местно-распространенного немелкоклеточного рака легкого и экспрессия генов химиорезистентности (<http://vak2.ed.gov.ru/idcUploadAutoref/renderFile/174736>)

Авторы: Юмов Евгений Леонидович.

Год публикации: 2014. Тип публикации: автореферат диссертации.

<http://vak2.ed.gov.ru/idcUploadAutoref/renderFile/174736>

(<http://vak2.ed.gov.ru/idcUploadAutoref/renderFile/174736>)

[Показать заимствования \(10\)](#)

2.2%

6. Постеры (<http://cyberleninka.ru/article/n/postery-1>)

Год публикации: 2014. Тип публикации: статья научного журнала.

<http://cyberleninka.ru/article/n/postery-1> (<http://cyberleninka.ru/article/n/postery-1>)

[Показать заимствования \(9\)](#)

1.79%

7. Экспрессия генов множественной лекарственной устойчивости и монорезистентности при немелкоклеточном раке легкого (<http://cyberleninka.ru/article/n/ekspressiya-genov-mnozhestvennoy-lekarstvennoy-ustoychivosti-i-monorezistentnosti-pri-nemelkokletochnom-rake-legkogo>)

Авторы: Юмов Е. Л., Цыганов М. М., Литвяков Николай Васильевич.

Год публикации: 2014. Тип публикации: статья научного журнала.

<http://cyberleninka.ru/article/n/ekspressiya-genov-mnozhestvennoy-lekarstvennoy-ustoychivosti-i-monorezistentnosti-pri-nemelkokletochnom-rake-legkogo>

(<http://cyberleninka.ru/article/n/ekspressiya-genov-mnozhestvennoy-lekarstvennoy-ustoychivosti-i-monorezistentnosti-pri-nemelkokletochnom-rake-legkogo>)

[Показать заимствования \(6\)](#)

1.39%

8. Клинические особенности различных генотипических вариантов при наследственном и спорадическом раке молочной железы
 (<http://cyberleninka.ru/article/n/klinicheskie-osobennosti-razlichnyh-genotipicheskikh-variantov-pri-nasledstvennom-i-sporadicheskom-rake-molochnoy-zhelezy>)

Авторы: Сытенкова К. В., Поспехова Н. И., Поддубная И. В., Любченко Людмила Николаевна.

Год публикации: 2011. Тип публикации: статья научного журнала.

<http://cyberleninka.ru/article/n/klinicheskie-osobennosti-razlichnyh-genotipicheskikh-variantov-pri-nasledstvennom-i-sporadicheskom-rake-molochnoy-zhelezy>.

(<http://cyberleninka.ru/article/n/klinicheskie-osobennosti-razlichnyh-genotipicheskikh-variantov-pri-nasledstvennom-i-sporadicheskom-rake-molochnoy-zhelezy>)

[Показать заимствования \(5\)](#)

1.35%

9. Патогенетическая связь показателей иммунной системы и противоопухолевого эффекта неoadъювантной химиотерапии у больных раком молочной железы
 (<http://vak2.ed.gov.ru/idcUploadAutoref/renderFile/125304>)

Авторы: Кухарев Ярослав Викторович.

Год публикации: 2013. Тип публикации: автореферат диссертации.

<http://vak2.ed.gov.ru/idcUploadAutoref/renderFile/125304>

(<http://vak2.ed.gov.ru/idcUploadAutoref/renderFile/125304>)

[Показать заимствования \(4\)](#)

1.15%

[Дополнительно](#)

[Общеизвестные фрагменты](#)

[Значимые оригинальные фрагменты](#)

[Библиографические ссылки](#)

[Искать в Интернете](#)