

Анализ экспрессии рецепторов эстрогена, прогестерона, HER2/neu и пролиферативного фактора Ki67 при раке молочной железы методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Лещенко Алла Сергеевна

Студент (магистр)

Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

E-mail: leshchenkoalla@gmail.com

Рак молочной железы (РМЖ) является самой распространенной причиной смертности от онкологических заболеваний у женщин в возрасте 40-69 лет. Диагностика и лечение РМЖ является первичной и крайне важной социальной и медицинской задачей, стоящей перед здравоохранением.

Клинически значимыми показателями в диагностике РМЖ является увеличенная экспрессия: а) ER и PgR (70-75% всех случаев РМЖ) - показание к назначению гормонотерапии; б) рецептора HER2/neu - маркер высоко агрессивной формы РМЖ и показание к использованию таргетного препарата Герцептинтм; в) пролиферативного фактора Ki-67 - отражает способность опухоли к метастазированию.

На сегодняшний день «золотым стандартом» диагностики экспрессионного статуса генов ER, PgR, HER2/neu и Ki67 при РМЖ является иммуногистохимический метод с применением зарубежных тест-систем. Однако ИГХ диагностика имеет ряд существенных недостатков, что приводит к появлению до 15%-17% случаев неправильного выбора лекарственной терапии.

Целью работы является: разработка прототипа тест-системы для диагностики рецепторного статуса опухолей РМЖ на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Для проведения исследования была собрана коллекция образцов РМЖ, включающая 39 свежих образцов опухоли молочной железы (участок злокачественной трансформации и нормальная ткань от тех же пациенток) и 39 архивных образцов, имевших ИГХ характеристику статуса рецепторов ER, PgR, HER2 и пролиферативного фактора Ki-67. Все образцы были представлены ГБУЗ НСО «Новосибирский областной онкологический диспансер» (Новосибирск, Россия).

Экспериментальная часть исследования была разделена на несколько этапов: выделение мРНК из клеток, получение кДНК (реакция обратной транскрипции), постановка ПЦР в режиме реального времени, валидация тест-системы.

Для реакции обратной транскрипции (ОТ) и ПЦР были подобраны и оптимизированы следующие параметры: для ОТ - время инкубации РНК и температура, концентрация фермента в реакционной смеси; для ПЦР - количество ДНК матрицы, количество праймеров, концентрация ионов магния, концентрация полимеразы.

Валидация разработанной тест-системы проводилась путем сопоставления результатов, полученных методом ОТ-ПЦР, с результатами ИГХ анализа тех же образцов. Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью программы MedCalc v.14.12.0 (Microsoft corp.)

Выводы. В ходе обзора современных методов диагностирования рецепторного статуса опухолей РМЖ были рассмотрены существующие и передовые технологии и сделан вывод о том, что использование технологии ПЦР в режиме реального времени - лучшая альтернатива технологии ИГХ, которая на сегодняшний день является стандартом определения

экспрессии ER, PgR, HER2/neu и Ki-67.

Разработан и оптимизирован прототип тест-системы для детекции ER, PgR, HER2/neu и пролиферативного фактора Ki67 в образцах РМЖ методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Конкурс «УМНИК» Фонда Содействия развитию МП в НТС от 12.05.2014г.

Слова благодарности

Я выражаю глубокую признательность за помощь в процессе подготовки научно-исследовательской работы моему научному руководителю - Наталье Юрьевне Маценко.

Иллюстрации

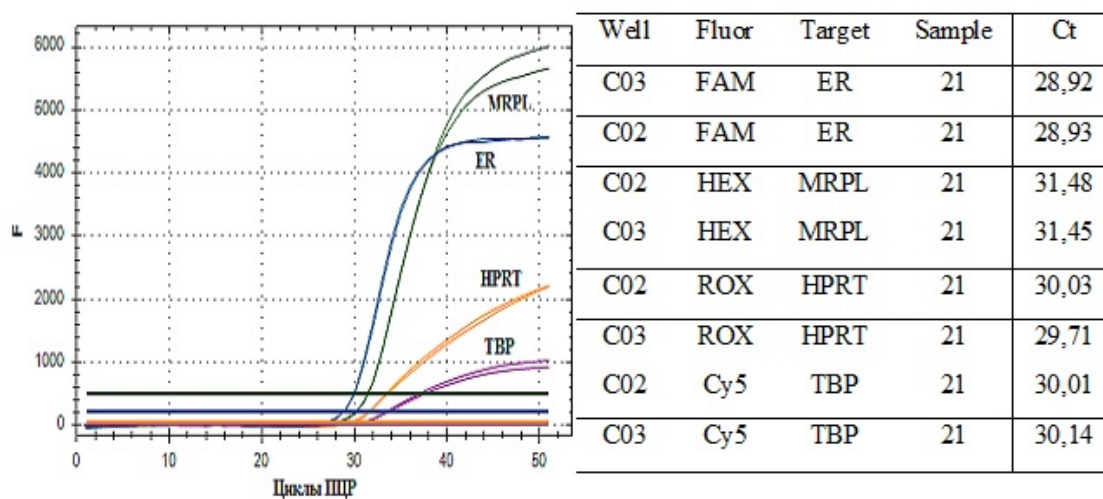


Рис. 1. Флуоресцентные кривые, полученные в ходе проверочной ОТ-ПЦР для образца РНК №21, полученной из неизменной свежемороженой ткани молочной железы человека. ОТ-ПЦР выполнена на приборе (CFX96, Bio-Rad, США). Слева – флуоресцентные кривые регистрации ПЦР-продукта кДНК. Определение экспрессии ER относительно референсных генов: MRPL, HPRT, TBP. Справа в таблице отражены загрузочные параметры ОТ-ПЦР и значения Ct для каждого образца.