



*Ю. Е. Демидчик
С. А. Костюк
И. Ю. Третьяк*

**МЕХАНИЗМЫ
КЛЕТОЧНОЙ
ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ
ПРИ РАКЕ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
Отделение медицинских наук
БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

Ю. Е. Демидчик
С. А. Костюк
И. Ю. Третьяк

**МЕХАНИЗМЫ
КЛЕТОЧНОЙ
ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ
ПРИ РАКЕ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Минск
«Беларуская навука»
2016

УДК 618.19-006.6:615.28(476)

Демидчик, Ю. Е. Механизмы клеточной химиорезистентности при раке молочной железы / Ю. Е. Демидчик, С. А. Костюк, И. Ю. Третьяк. – Минск : Беларуская навука, 2016. – 152 с. – ISBN 978-985-08-1991-8.

В монографии подробно описаны принципы молекулярно-биологических методов, которые используются в онкологии, обобщены данные о механизмах клеточной химиорезистентности при раке молочной железы, преимущественно ассоциированных с изменением функциональной активности белков семейства АВС-ранспортеров, глутатион-S-трансфераз. Определен круг наиболее прогностически значимых факторов развития клеточной химиорезистентности при раке молочной железы.

Предназначена для врачей-онкологов, онкологов-хирургов, врачей клинической лабораторной диагностики, а также врачей широкого профиля.

Табл. 29. Ил. 29. Библиогр.: 175 назв.

Р е ц е н з е н т ы:

доктор медицинских наук М. В. Фридман,
доктор медицинских наук, профессор В. И. Прохорова,
доктор медицинских наук, профессор Ю. М. Гаин

ISBN 978-985-08-1991-8

© Демидчик Ю. Е., Костюк С. А.,
Третьяк И. Ю., 2016

© Оформление. РУП «Издательский
дом «Беларуская навука», 2016

ПРЕДИСЛОВИЕ

В монографии подробно описаны принципы молекулярно-биологических методов, используемых в онкологии, освещены механизмы клеточной химиорезистентности при раке молочной железы, преимущественно ассоциированные с изменением функциональной активности белков семейства ABC-транспортеров, глутатион-S-трансфераз. Представлены новые сведения о роли глутатион-S-трансфераз и ABC-транспортеров как предикторов клинического исхода у пациенток, страдающих раком молочной железы.

В одной из глав книги приведены характеристики основных диагностических и прогностических молекулярных маркеров, применяемых в онкологии, предложены стратегии выбора маркеров и методов анализа в зависимости от целей и задач, которые стоят перед практическим здравоохранением.

Отдельные главы в книге посвящены анализу современных достижений в области изучения механизмов клеточной химиорезистентности при раке молочной железы, связанных с изменением экспрессии белков семейства ABC-транспортеров, глутатион-S-трансфераз. В связи с преимущественным изучением по литературным данным экспрессии GST и ABC-транспортеров иммуногистохимическим методом (определение экспрессии белков), а также ПЦР (полиморфизм генов *GST*, *ABC*), представлены результаты собственных исследований по разработке методики определения уровней нормализованной экспрессии генов семейств *ABC*, *GST*.

Особый интерес вызовут главы, в которых представлена роль экспрессии генов семейств *ABC*, *GST* в определении различий в реакциях на противоопухолевое лечение.

Авторами с благодарностью будут восприняты и учтены в дальнейшей работе все замечания и пожелания читателей.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большое количество научных исследований посвящено изучению отдельных молекулярно-биологических характеристик опухолевой ткани, однако из-за множества потенциально значимых факторов и больших различий в данных об их прогностической значимости, представленных в литературе, выбор определенного типа терапии остается затруднительным. При этом сегодня назначение большинства противоопухолевых препаратов основывается не на индивидуализированном подходе, а на статистической вероятности получения положительного эффекта. Недостатки эмпирического подхода для выбора терапии представляются особенно очевидными именно в онкологии: отсутствие достаточного резерва времени для оптимизации лечения, выраженные побочные эффекты химиотерапии, высокая стоимость большинства цитостатиков [12].

Рак молочной железы (РМЖ) занимает одно из ведущих мест в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями в большинстве стран мира, в том числе в Республике Беларусь. За последние 10 лет (2004–2013 г.) отмечено увеличение количества первичных случаев этого новообразования с 65,9 до 76,4 на 100 тыс. женского населения. Следует отметить, что в течение последних лет смертность от РМЖ в нашей стране устойчиво занимает первое место в структуре смертности от злокачественных новообразований среди женского населения, составив в 2013 г. 17,0% от числа всех умерших [21]. Таким образом, неуклонный рост заболеваемости РМЖ, высокая смертность от данной патологии делает исследование этого заболевания одним из самых актуальных в клинической онкологии. Как правило, ко

времени выявления данное заболевание представляет собой системный опухолевый процесс, лечение которого требует применения цитостатиков [18].

Согласно современным представлениям, эффективность химиотерапии зависит от степени фармакокинетической чувствительности раковых клеток и в значительной мере обусловлена васкуляризацией новообразования, определяющей условия для высокой либо низкой концентрации противоопухолевых препаратов [108]. Резистентность раковых клеток в основном представляет собой проявление фенотипа множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) с их перекрестной невосприимчивостью к воздействию широкого круга структурно и функционально «неродственных» цитостатиков [32].

Основные механизмы формирования МЛУ включают в себя уменьшение накопления чужеродного вещества за счет активации энергозависимого обратного транспорта химиопрепарата из клетки, стимуляцию системы внутриклеточной детоксикации и усиление репарации внутриклеточных повреждений [1]. При этом одной из наиболее частных причин МЛУ считается активация выброса противоопухолевых лекарственных средств из клетки вследствие повышенной экспрессии белков семейства ABC-транспортеров (АТФ-зависимые транспортеры, ATP Binding Cassette transporters). Глутатион-S-трансферазы (GST) находятся в центре внимания при характеристике лекарственно-устойчивых клеток, принимая участие в детоксикации ксенобиотиков [161]. Полагается, что количество цитостатиков, резистентность к которым определяется усилением репарации внутриклеточных повреждений, значительно меньше, чем химиопрепаратов, лекарственная устойчивость к которым обусловлена первыми двумя механизмами [1]. Соответственно, изучение и понимание молекулярных механизмов, оказывающих влияние на течение опухолевого процесса, представляются важными и перспективными в лечении рака молочной железы.

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ОНКОЛОГИИ

1.1. Диагностика злокачественных новообразований

Достижения генетики и молекулярной биологии последних десятилетий оказали огромное влияние на понимание природы инициализации и прогрессии злокачественных новообразований. Рак представляет собой гетерогенную группу заболеваний, в основе возникновения которых лежит комплекс генетических нарушений, обеспечивающих возможность неконтролируемого роста опухолевых тканей и способность к метастазированию. Онкологические заболевания характеризуются клональной эволюцией трансформированных клеток. Одним из механизмов возникновения раковых клеток является трансформация нормальных клеток вследствие накопления наследуемых (герминативных) и приобретенных (соматических) мутаций в критических протоонкогенах и ассоциированных с опухолями генах-супрессорах. Эти знания открыли принципиально новые возможности в диагностике и лечении злокачественных новообразований [30, 105].

Влияние конкретных генетических нарушений, лежащих в основе опухолевого роста, позволило обнаружить специфические молекулярные маркеры и разработать на их основе тесты ранней диагностики опухолей. Современная диагностика опухолей предусматривает обязательное применение наряду с классическими морфологическими методами иммуноцитохимических и молекулярно-генетических методов [7].

Есть и другой аспект проблемы, который связан с ранним распознаванием метастазов. Наличие минимальной остаточной опухоли и микрометастазов существенно ограничивает перспек-

тиву дальнейшего увеличения показателей выживаемости. До последнего времени поиск микрометастазов осуществляли только традиционными методами световой микроскопии, которые в большинстве случаев оказываются неэффективными. Развитие иммуноцитохимических и молекулярно-биологических технологий сделало возможной идентификацию единичных изолированных опухолевых клеток в лимфатических узлах, серозных жидкостях организма, периферической крови и костном мозге. В частности, удастся выявить одну опухолевую клетку среди 1 млн разнообразных по своей природе кроветворных клеток костного мозга [19, 55].

1.2. Маркеры опухолевого роста и их выявление

Выделяют три группы маркеров опухолевого роста: белок-ассоциированные маркеры, РНК-маркеры и ДНК-маркеры.

Белок-ассоциированные маркеры могут определяться в обычных пробах крови рутинными биохимическими и иммунохимическими методами. Среди таких маркеров следует упомянуть простатоспецифический антиген (ПСА) при раке предстательной железы, СА 125 при раке яичника, раково-эмбриональный антиген (РЭА) при карциномах органов пищеварительного тракта, человеческий хорионический гонадотропин при трофобластических опухолях, альфа-фетопротеин при гепатоцеллюлярном раке и эмбриональных карциномах. Выявление этих белков важно для определения прогноза и мониторинга заболевания, раннего обнаружения метастазов и рецидивов опухоли. Однако их применение ограничено, так как они недостаточно специфичны для какой-либо одной опухоли или типа опухолей, а их присутствие в крови часто указывает на уже распространенный процесс [19, 130].

Использование маркеров, ассоциированных с РНК, основано на наличии мутаций в протоонкогенах и генах-супрессорах опухолей, которые могут определяться и в транскриптах. Проведение диагностики на основе РНК-маркеров является трудоемким, так как они легко деградируют, но оценка экспрессии генов на

уровне РНК может быть использована как важный диагностический критерий. Современные методы позволяют определять экспрессию тех или иных мутантных генов путем выделения РНК из клинического материала с последующей обратной транскрипцией (ОТ) и полимеразной цепной реакцией (ПЦР) для амплификации ДНК (ОТ-ПЦР) [52].

Анализ цельной крови и костного мозга на наличие аномальных транскриптов, полученных из трансформированных клеток, применяют для мониторинга пациентов с хроническим миелолейкозом, минимальной резидуальной болезнью. Наиболее перспективно использование этого метода для обнаружения микрометастазов – единичных опухолевых клеток в тканях [7].

ДНК-маркеры – самый распространенный субстрат для молекулярно-биологической диагностики, так как ДНК стабильна и может быть быстро амплифицирована с использованием методики ПЦР, что дает возможность обойтись минимальным количеством клеточного материала. При диагностике онкологических заболеваний с использованием ДНК-маркеров выявляют мутации гена *p53* в ДНК, выделенной из мочи пациентов с раком мочевого пузыря, а также мутации онкогена *Ras* в ДНК, выделенной из биологического материала пациентов с колоректальным раком. Мутации генов *p53* и *Ras* выявляют также в ДНК, выделенной из мокроты пациентов с раком легкого [7, 19, 105].

Важное место в обнаружении опухолевых клеток занимает анализ повторов последовательностей нуклеотидов в микросателлитной ДНК, который позволяет установить как наличие новой аллели гена (что свидетельствует о нестабильности микросателлитной ДНК), так и потерю одной из его аллелей (потерю гетерозиготности). Такие находки указывают на присутствие клеточных клонов, содержащих измененную генетическую информацию, что характерно для опухолевых клеток. Анализ микросателлитной ДНК применяют при исследовании мочи у больных раком мочевого пузыря и гипернефромой, слюны при опухолях головы и шеи, панкреатического сока при раке поджелудочной железы, изучении пункционных аспиратов при раке молочной железы, мокроты при раке легкого [19, 30, 96].

В целом обнаружение в клинических образцах потери гетерозиготности и/или нестабильности микросателлитной ДНК указывает на присутствие клеток, несущих искаженную информацию, свойственную опухолевому росту [7].

Известно, что нормальные и опухолевые клетки различаются по экспрессии многих сотен генов, поэтому разработаны современные методы серийного анализа экспрессии, основанные на технологии микрочипов и позволяющие оценивать сотни и даже тысячи генов одновременно [30, 92].

Одним из новых перспективных молекулярных маркеров опухоли является телоизомераза, рибонуклеопротеиновый фермент, наращивающий нуклеотидные последовательности на концах хромосом (теломерах). Активность данного фермента постоянно присутствует в более чем 90% опухолей и практически не обнаруживается в нормальных тканях.

ДНК-тестирование успешно применяется при различных наследуемых опухолях: ретинобластоме, полипозе кишечника, множественных эндокринных опухолях второго типа (MEN2), а также гены предрасположенности к раку молочной железы и яичников BRCA I, BRCA II [28, 96, 120, 121, 175].

Внедрение современных методов молекулярной диагностики в широкую онкологическую практику неизбежно потребует серьезного технического перевооружения существующих клинических лабораторий и специально подготовленного персонала. Сами методы диагностики при этом должны пройти масштабные клинические испытания с учетом принципов рандомизации [30].

Несмотря на возможности, связанные с использованием перечисленных маркеров опухолевого роста, пока еще не существует абсолютно надежных методов ранней (досимптомной) диагностики опухолей. В преобладающем большинстве случаев врачам-онкологам приходится иметь дело с уже развившимися опухолями. И основными задачами лабораторной службы являются морфологическое подтверждение диагноза, установление гистоструктуры и гистогенеза опухоли, определение степени ее злокачественности, выявление метастатического поражения регио-

нарных и отдаленных лимфатических узлов, других органов, дифференциальная диагностика с иными патологическими процессами. Решая эти вопросы, используют материал, полученный при биопсии опухолей и лимфатических узлов, клетки крови, пунктаты костного мозга, экссудаты из серозных полостей, а также смывы и соскобы, сделанные во время оперативного вмешательства [7, 19, 55, 150].

Методы молекулярной диагностики имеют несомненную перспективность и высокую точность, однако вопрос об их специфичности и чувствительности сохраняет свою актуальность. Это связано с тем, что опухоли всегда состоят из смеси нормальных и злокачественных клеток, поэтому выделяемая из них ДНК также гетерогенна, что необходимо учитывать при решении вопроса о применимости молекулярных тестов [30].

Тем не менее методики, базирующиеся на ПЦР, технологически исключительно чувствительны и способны обнаруживать специфические генетические нарушения задолго до формирования морфологически определяемой опухоли [19].

В настоящее время сформировалось несколько направлений использования молекулярных тестов в онкологии:

1. Раннее выявление опухолей наиболее часто основывается на определении мутаций *ras* и *p53*, обнаружение которых позволяет в некоторых случаях судить о стадии опухолевого процесса. Информативным ранним маркером рака толстой кишки служат мутации гена *APC*. Микросателлитные маркеры высокоэффективны для ранней диагностики рака мочевого пузыря и простаты. Широкий спектр опухолей может быть диагностирован с использованием протоколов активности телоизомеразы.

2. Метастазирование и распространенность опухоли также могут оцениваться с применением молекулярных тестов. Наиболее часто для этих целей используют ОТ-ПЦР, т. е. с помощью РНК-маркеров выявляют изменения экспрессии генов в опухолевых клетках.

3. Анализ цитологических и гистологических препаратов с помощью молекулярных тестов. Примером может служить определение вирусов папилломы человека (ВПЧ) при раке шейки

матки, а также применение молекулярных тестов для выявления мутаций онкогенов непосредственно на гистологических срезах.

4. Промежуточные биомаркеры служат для выявления клональных и генетических изменений, позволяющих предсказать появление опухолей (табл. 1).

5. Генетическое тестирование онкологического риска стало возможным в связи с открытием генов предрасположенности к онкологическим заболеваниям, что оказалось особенно актуальным для оценки риска среди членов так называемых «высокорисковых» семей [30].

Таблица 1. Опухоли и прогностические ДНК-маркеры или их РНК-продукты

Вид опухоли	ДНК-маркеры неблагоприятного прогноза	ДНК-маркеры благоприятного прогноза
Рак молочной железы	RHMM, CCND1, ST3Gal I и ST3Gal III, HGF, MDR1, HER2, ERBB2	Ген стероидной сульфатазы, кадгерина-11
Рак предстательной железы	Эктопическая экспрессия в тестикулах гена <i>TSPY</i> , гиперэкспрессия орнитин-карбоксилазы, отсутствие экспрессии трансформирующего фактора роста (TGF-1)	
Немелкоклеточный рак легкого	Гиперэкспрессия циклинзависимых киназ Cdc25A и Cdc 25B, снижение экспрессии ингибитора клеточного цикла p27 KIP1, аллельная потеря антионкогена FHIT	Экспрессия гена <i>TSP2</i>
Колоректальные опухоли	Повышенная экспрессия катепсина D, CD44, p53, и тимидилатсинтазы, экспрессия генов <i>MRP 1</i> и рецептора витамина D, отсутствие экспрессии p21 и потеря гетерозиготности по маркерам длинного плеча хромосомы 18	
Карциномы пищевода и желудка	Гиперэкспрессия генов <i>ST3</i> , <i>BM-40/SPARK</i> , <i>MET</i> , потеря гетерозиготности по маркерам длинного плеча хромосомы 18	

Вид опухоли	ДНК-маркеры неблагоприятного прогноза	ДНК-маркеры благоприятного прогноза
Рак поджелудочной железы	Гиперэкспрессия генов транскрипционного фактора <i>Id2</i> , каспазы-1, тимидин-фосфорилазы, потеря гетерозиготности по короткому плечу хромосомы 1	
Глиомы	Экспрессия гена опухоль-ассоциированного антигена <i>Gage</i> и гомозиготные делеции длинного плеча хромосомы 10, включая ген-супрессор <i>PTEN</i>	
Карцинома печени	Гиперэкспрессия генов циклина А	
Саркома мягких тканей конечностей	Гиперэкспрессия генов циклина А	
Карцинома почки	Экспрессия гена кадгерина-6	

Примечание. Обозначения: CCND1 – ген циклина, ERBB2 – ген эстрогеновых рецепторов, HGF – ген фактора роста гепатоцитов, ST3Gal I и ST3Gal III – гены сиалотрансферазы, MDR1 – ген лекарственной резистентности, TGF-I – ген трансформирующего фактора роста, TSP2 – ген тромбоспондина.

Основные цели молекулярной диагностики в онкологии:
 выявление наследственных опухолевых синдромов;
 выбор терапии на основе молекулярных характеристик опухоли;
 детекция диссеминированных (циркулирующих) опухолевых клеток [9].

1.3. ПЦР и ее модификации, используемые для выявления и изучения ДНК

Полимеразная цепная реакция. Среди методов, обеспечивших прогресс в молекулярно-биологической диагностике в онкологии, центральное место принадлежит полимеразной цепной реакции. ПЦР является ферментной реакцией, позволяющей в относительно короткое время (часы) синтезировать миллионы копий выбранных участков ДНК. Количество исходного исполь-

зубею для амплификации материала может быть мало – от пико- до наногаммов ДНК. ПЦР составляют три повторяющихся последовательных этапа, проводимых в одной пробирке.

Основные стадии ПЦР-анализа:

1. Денатурация – расхождение цепей двойной спирали ДНК, которое достигается при нагревании до 91–95 °С.

2. Отжиг – при снижении температуры до 50–70 °С находящиеся в реакционной смеси праймеры связываются с комплементарным участком одноцепочных ДНК. (Праймеры, короткие олигонуклеотидные затравки длиной 18–30 нуклеотидов, определяют специфичность ПЦР.)

3. Элонгация – при температуре 72 °С фермент Таq-полимераза начинает удлинять праймер, присоединяя к нему нуклеотиды в последовательности, задаваемой ДНК-матрицей. После первого цикла как исходная ДНК, так и ДНК, образованная в ходе ферментативной реакции, служат матрицами на втором и последующих циклах.

Последовательное изменение температурных режимов в специальных термоциклерах (амплификаторах) при достаточном количестве праймеров и нуклеотидов обеспечивают увеличение концентрации исследуемых участков ДНК в несколько миллионов раз за 30–35 циклов.

Изменения в последовательности ДНК могут являться следствием полиморфизма или мутаций. Данные особенности генома могут служить ДНК-маркерами того или иного патологического состояния и могут быть проанализированы с использованием следующих методик:

1. Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов – RFLP;

2. Аллель-специфичная ПЦР (AS-PCR), аллель-специфичная олигонуклеотидная гибридизация – ASO-H;

3. Анализ вариаций в количестве tandemных повторов в ДНК – VNTR (микросателлитный анализ) [20].

В основе методов групп 2 и 3 лежит ПЦР.

Техника **RFLP** включает экстракцию ДНК, расщепление соответствующими рестриктазами, электрофорез, приготовление, экстракцию, изоляцию, очистку и мечение радиоактивной меткой

ДНК пробы, Саузерн-блоттинг, гибридизацию и наконец, ауто-радиографию для визуализации ДНК полос. Саузерн-блоттинг используется для определения размера ДНК-фрагментов после их расщепления рестриктазами и гель-электрофореза. ДНК-фрагменты переносятся на нейлоновую мембрану для реакции с меченой пробой, что позволяет визуализировать полосы ДНК и определить молекулярный вес фрагментов [20, 131].

RFLP сегодня вытеснена методиками, в основе которых лежит ПЦР, поскольку RFLP требует длительного времени на проведение и использования радиоактивных меток для визуализации полос ДНК [131].

Аллель-специфичная ПЦР (AS-PCR) основана на том, что только олигонуклеотиды, последовательность которых абсолютно соответствует исследуемой последовательности, способны связываться с матрицей. Данная методика адаптирована для выявления точечных мутаций в онкогенах (например, точечных мутаций онкогена *ras*). В данной технологии праймеры конструируются таким образом, что они комплементарны или дикому, или мутантному типу гена, в реакции участвует также общий праймер. Поскольку у ДНК-полимеразы отсутствует 3'-экзонуклеазная активность, она не способна исправить однонуклеотидное несоответствие между праймером и матрицей на 3'-конце ДНК-праймеров. Таким образом, если олигонуклеотидные праймеры сконструированы так, что содержат несоответствия с одной из матриц (дикой или мутантной) вблизи или на 3'-конце, то не будет происходить элонгации. Поэтому амплифицироваться будет только та матрица, которой соответствует последовательность праймера [131].

Долгосрочная (long-range) ПЦР была разработана в связи с тем, что размер фрагмента ДНК, амплифицируемого термостабильной полимеразой, ограничен, а именно, для геномной ДНК максимальная длина амплифицированного фрагмента составляет 3–4 кб. В основе данного ограничения лежит частота ошибок Taq-ДНК-полимеразы, которая составляет $2 \times 10^{-4} - 2 \times 10^{-5}$ мутаций на нуклеотид в одном цикле. Включение ошибочного нуклеотида способствует задержке элонгации, что приводит к тому,

что Taq-ДНК-полимераза покидает цепь. Чем длиннее фрагмент, тем больше вероятность включения ошибочного нуклеотида. Было показано, что включение в реакцию фермента, который способен исправлять ошибки Taq-ДНК-полимеразы, способствует тому, что нуклеотидные несоответствия устраняются и Taq-ДНК-полимераза способна дольше удерживаться на матрице, следовательно, можно получить продукт амплификации большей длины. Использование комбинации ферментов позволяет добиться амплификации матрицы геномной ДНК до 22 кб.

Метод нашел применение в мониторинге структурных изменений в митохондриальной ДНК (мхДНК), быстрой амплификации и картировании областей хромосомных транслокаций, амплификации протяженных зон тринуклеотидных повторов.

При проведении долгосрочной ПЦР с обратной транскрипцией (long-range ОТ-ПЦР) используют исправляющий фермент на этапе элонгации ДНК. Метод применяется в выявлении делеций в экзонах, используется для предварительного обогащения ДНК матриц перед другими тестами выявления мутаций [20, 131].

Анализ вариации в нуклеотидной последовательности **методом твердофазного мини-секвенирования (ТМС)** разработан для анализа ДНК фрагментов, которые отличаются друг от друга нуклеотидами в одной или нескольких позициях. В данном методе не используется гель-электрофорез. ТМС включает этап амплификации с использованием одного биотинилированного и одного небитинилированного праймера. Продукты амплификации наносятся на подложку, на которой иммобилизованы авидин- или стрептовидин-ловушки. Цепи ДНК, которые несут биотиновую метку праймера, взаимодействуют с ловушками и оказываются связанными с подложкой. Нуклеотид в переменном сайте детектируется на иммобилизованном ДНК-фрагменте в реакции элонгации праймера: праймер этапа детекции взаимодействует с матрицей ДНК прямо около переменного сайта, который анализируется, ДНК-полимераза включает меченый нуклеотид. Если имеет место различие в нуклеотиде в исследуемой позиции полинуклеотидной цепи образцов, то количество включенных разных меченых нуклеотидов будет отличаться.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Перечень условных обозначений	3
Предисловие	4
Введение	5
<i>Глава 1. Молекулярно-биологические методы в онкологии (Костюк С. А.)</i> ...	7
1.1. Диагностика злокачественных новообразований	7
1.2. Маркеры опухолевого роста и их выявление	8
1.3. ПЦР и ее модификации, используемые для выявления и изучения ДНК	13
1.4. Модификации ПЦР для неинвазивной детекции минорных фракций ДНК	40
1.5. Молекулярно-биологические подходы к идентификации групп онкологического риска	47
1.6. Диагностические и прогностические молекулярные маркеры в онкологии, стратегия выбора и методы анализа	51
1.7. Молекулярная онкология и новые подходы к терапии опухолей ..	53
1.8. Выявление единичных опухолевых клеток посредством молекулярно-биологических методов	60
<i>Глава 2. Биологическое значение и механизмы действия глутатион-S-трансфераз (Демидчик Ю. Е., Костюк С. А., Третьяк И. Ю.)</i>	64
Методика определения уровня нормализованной экспрессии генов семейства <i>GST</i>	68
<i>Глава 3. Глутатион-S-трансферазы как факторы риска развития рака молочной железы (Демидчик Ю. Е., Третьяк И. Ю.)</i>	71
<i>Глава 4. Глутатион-S-трансферазы как предикторы клинического исхода у пациенток, страдающих раком молочной железы (Демидчик Ю. Е., Третьяк И. Ю.)</i>	75
4.1. Глутатион-S-трансферазы как предикторы химиорезистентности при раке молочной железы	75
4.2. Значение глутатион-S-трансфераз в прогнозировании эффекта лучевой терапии	87

Глава 5. Значимость экспрессии генов семейства <i>GST</i> у пациенток, страдающих раком молочной железы (Третьяк И. Ю.)	90
5.1. Установление ассоциации экспрессии генов семейства <i>GST</i> и клинико-морфологических характеристик у пациенток с отечно-инфильтративным и первично-диссеминированным раком молочной железы...	90
5.2. Оценка значимости экспрессии генов семейства <i>GST</i> в течении заболевания у пациенток с отечно-инфильтративным и первично-диссеминированным раком молочной железы	99
Глава 6. Белки-транспортёры семейства <i>ABC</i> и их роль в развитии химиорезистентности при раке молочной железы (Демидчик Ю. Е., Костюк С. А., Третьяк И. Ю.)	104
6.1. Экспрессия Р-гликопротеина (<i>ABCB1</i> , <i>MDR1</i>) при раке молочной железы	106
6.2. Экспрессия <i>ABCC1</i> (<i>MRP1</i>) при раке молочной железы.....	110
6.3. Экспрессия <i>ABCG2</i> (<i>BCRP</i> , <i>MXR</i> , <i>ABCP</i>) при раке молочной железы	112
6.4. Экспрессия <i>ABCC2</i> (<i>MRP2</i>) при раке молочной железы.....	114
6.5. Экспрессия <i>ABCC5</i> при раке молочной железы	116
6.6. Экспрессия <i>ABCA12</i> при раке молочной железы	117
6.7. Методика определения уровня нормализованной экспрессии генов семейства <i>ABC</i>	117
Глава 7. Роль белков-транспортёров семейства <i>ABC</i> в прогнозировании клинического исхода у пациенток, страдающих раком молочной железы (Третьяк И. Ю.)	122
7.1. Установление ассоциации экспрессии генов семейства <i>ABC</i> и клинико-морфологических характеристик у пациенток, страдающих отечно-инфильтративным и первично-диссеминированным раком молочной железы.....	122
7.2. Оценка ассоциации экспрессии генов семейств <i>ABC</i> , <i>GST</i> с ответом опухоли на цитостатическую терапию с включением антрациклинов у пациенток с отечно-инфильтративным и первично-диссеминированным раком молочной железы	127
7.3. Анализ взаимосвязи экспрессии генов семейств <i>ABC</i> , <i>GST</i> и степени распространенности опухолевого процесса у пациенток, страдающих отечно-инфильтративным и первично-диссеминированным раком молочной железы	131
Заключение	135
Литература	139

Научное издание

Демидчик Юрий Евгеньевич,
Костюк Светлана Андреевна,
Третьяк Ирина Юрьевна

**МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОЙ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ
ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Редактор *О. Н. Пручковская*
Художественный редактор *Т. Д. Царева*
Технический редактор *О. А. Толстая*
Компьютерная верстка *Ю. А. Агейчик*

Подписано в печать 14.04.2016. Формат 60×84¹/₁₆. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 8,95. Уч.-изд. л. 7,2. Тираж 120 экз. Заказ 78.

Издатель и полиграфическое исполнение:
Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом
«Беларуская навука». Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий № 1/18 от 02.08.2013.
Ул. Ф. Скорины, 40, 220141, г. Минск.