МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

ЦЕНТЪР ПО МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА

ДАНИЕЛА РОСЕНОВА ПЕНЧЕВА

СЪВРЕМЕННИ ПОДХОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИТЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА РАКА НА ГЪРДАТА В БЪЛГАРИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на
Образователна и научна степен „ДОКТОР“

Научна специалност: „Молекулярна биология”
Професионално направление 4.3. Биологически науки
Област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:
АКАД. ПРОФ. Д-Р ВАНЬО ИВАНОВ МИТЕВ, ДБН
ДОЦ. РАДКА ПЕТРОВА КЪНЕВА, ДБ
НАУЧЕН КОНСУЛТАНТ:
ГЛ. АСИСТ. Д-Р АТАНАСКА МИТКОВА, ДБ

София, 2017 г.

Всички изследвания по дисертационния труд са извършени в Центъра по Молекулна Медицина, Катедра Медицинска Химия и Биохимия, МФ, МУ – София.

Изследванията по дисертационния труд са финансирани от:

1. 2009г. - Национален Университетски комплекс за Биомедицински и приложни изследвания-DUNK01/2
2. 2010г. - Проследяване на нивата на циркулиращи туморни клетки (ЦТК) при болни с метастазирал карцином на гърдата- прогностично и предиктивно значение
3. 2013г. - Анализ на молекулни маркери в циркулиращи туморни клетки (ЦТК) от периферна кръв при български пациентки с метастазирал карцином на гърдата.
4. 2014г.- Анализ на спектъра от соматични мутации в тумори от български пациенти с рак на гърдата чрез секвениране от ново поколение.
5. 2014г.- Валидиране на протокол за секвениране от следващо поколение със секвенатор IonTorrent PGM за откриване на мутации в BRCA1 и BRCA2 гените
6. 2015г.- Анализ за наличие на герминативни мутации в панел от 94 тумор-асоциирани гени чрез новогенерационно секвениране при български пациенти с фамилен рак на гърдата

Автор: ДАНИЕЛА РОСЕНОВА ПЕНЧЕВА
Заглавие: СЪВРЕМЕННИ ПОДХОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИТЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА РАКА НА ГЪРДАТА В БЪЛГАРИЯ

Материалите по защитата са на разположение в Центъра по Молекулна Медицина, сградата на СБАЛАГ "Майчин дом" на ул. Здраве №2, ет. 14

Използвани съкращения на кирилица:

бд- базови двойки
ДНК- Дезоксирибонуклеинова киселина
ДТК- Дисеминирали туморни клетки
иРНК- информационна рибонуклеинова киселина
МРГ- Метастатичен рак на гърдата
ОО- Обективен отговор
РНК- Рибонуклеинова киселина
ЦММ- Център по молекулна медицина
ЦТК- Циркулиращи туморни клетки

Използвани съкращения на латиница:

bp (base pairs) - нуклеотидни бази
CI (confidence interval) – доверителен интервал
COSMIC (catalog of somatic mutations in cancer)- каталог на соматичните мутации при рака
CTC (Circulating tumor cells) - Циркулиращи туморни клетки
FP (False positive)- фалшиво позитивен
FN (False negative)- фалшиво негативен
GWAS (genome-wide association study) - целогеномно асоциативно проучване
HBOC (Hereditary Breast Ovarian Cancer) - наследствен рак на гърдата и яйчниците
HER2 (human epidermal growth factor receptor (HER/EGFR/ERBB) – рецептор за човешки епидермален растежен фактор
HR (Homologous Recombination) – хомоложна рекомбинация
IDC (Invasive Ductal Carcinoma) – инвазивен дуктален карцином
LCIS (Lobular carcinoma in situ) - лобуларен карцином in situ
NCCN (National Comprehensive Cancer Network) – нациоанална ракова мрежа
NGS (Next generation sequencing) - секвениране от ново поколение
OR (Odds Ratio) – съотношение на вероятност
PR (Progesteron receptor) – прогестеронов рецептор
PGM (Personal Genome Machine)- Персонална геномна машина за следващо поколение секвениране
PCR (Polimerase chain reaction)- Полимеразна верижна реакция
QPCR (quantitative PCR) – количествен quantitative PCR
RT PCR (Real Time PCR)- PCR в реално време
RT (Reverse transcription)- обратна транскрипция
ROI (Region of Interest)- регион от интерес
SNPs (Single nucleotide polimorphism) - еднонуклеотидни полиморфизми
SNV (Single nucleotide variant)- единичен нуклеотиден вариант
TNBC (triple negative breast cancer) - тройно негативен рак на гърдата
TNM (Tumor Nodal Metastasis)- класификация за туморите според стадия на тумора, наличие на инфектирани лимфни възли и наличие на метастази
TP (True positive)- Истински позитивен
TN (True negative)- Истински негативен

СЪДЪРЖАНИЕ

I. Въведение ……...….8
II. Цел и задачи ……..……..….9
2.1.Цели…….…. 9
2.2.Задачи ……..….9
2.2.1 Валидиране на протокол за следващо поколение секвениране с платформа Ion Torrent PGM за гените BRCA1 и BRCA2 …….…....9
2.2.2 Въвеждане на метод за бързо и надеждно диагностично изследва..не на панел от други гени, свързани с рак на гърдата при BRCA негативни пациентки и оценка на приноса на тези гени за предразположение към фамилен рак на гърдата ……..……9
2.2.3 Определяне на спектъра на соматични мутации в 48 тумор-асоциирани гена с платформа MiSeq,Illumina …….10
2.2.4 Въвеждане на метод за проследяване на пациентки с метастатичен рак на гърдата преди и по време на терапията използвайки циркулиращи туморни клетки ……..10
III. Материали и методи ……..….. 11
3.1. Валидиране на ION Torrent технология за NGS ……...11
3.1.1 Клиничен материал ……..…11
3.1.2. Преданалитична обработка на биологичния материал ……..11
3.1.2.1. Изолиране на високомолекулна ДНК от кръв…….. 11
3.1.2.2. Оценка на качеството и количеството на изолираната ДНК…….. 11
3.1.3. Аналитична обработка на биологичния материал ……..11
3.1.3.1. Намножаване на фрагменти ДНК чрез полимеразна верижна реакция (PCR – Polymerase Chain Reaction) ……11
3.1.3.2. Качествен контрол на PCR реакцията…….....11
3.1.3.3. Хоризонтална агарозна електрофореза ……..…11
3.1.3.4. Директно секвениране ……....11
3.1.3.5. Секвениране от второ поколение посредством Ion Torrent PGM (Personal Genome Machine) ……..11
3.2. Следващо поколение секвениране с панел от 94 тумор-асоциирани гени с платформа MiSeq, Illumina ……12
3.2.1. Клиничен материал ……12
3.2.2. Преданалитична обработка на биологичния материал ……..12
3.2.3. Аналитична обработка на биологичния материал ……..12
3.2.3.1. Секвениране с помощта на готов панел TruSight Cancer и система MiSeq на Illumina ……12
3.3 Анализ на спектъра от соматични мутации в тумори от български пациенти с рак на гърдата посредством MiSeq платформата за следващо поколение секвениране ……12
3.3.1 Клиничен материал ……12

3.3.2. Преданалитична обработка на биологичния материал ……..13
3.3.3. Аналитична обработка на биологичния материал ……..13
3.4 Проследяване на циркулиращи туморни клетки при болни с метастазирал рак на гърдата ……13
3.4.1. Клиничен материал ……14
3.4.2. Преданалитична и аналитична обработка на биологичния материал ……...14
3.4.2.1. Събиране на кръвни проби ……14
3.4.2.2. Изолиране и обогатяване на циркулиращи туморни клетки- AdnaTest BreastCancerSelect ……14
3.4.3 Аналитична обработка на биологичния материал ……...14
3.4.3.1. Изолиране на иРНК и качествен анализ- AdnaTest BreastCancerDetect ……14
3.4.3.2. Количествен анализ на експресията на молекулните маркери hMAM, CK-19, CD44 и CD24 в периферна кръв посредством Real Time RT-PCR ……..14
3.5 Биоинформатичен анализ на получените резултати…… 15
3.5.1. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от директното секвениране. При анализа на получените резултати бяха използвани следните софтуерни програми ……..15
3.5.2. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от секвенирането от ново поколение с Ion Torrent PGM ……....15
3.5.3. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от секвенирането от ново поколение с MiSeq ……..…15
3.6. Статистически анализ на получените резултати ……15
3.6.1 SPSS…….. ……...15
3.6.2. Нулева хипотеза (H_O) ……..…15
3.6.3. Метод χ^2 ……..15
3.6.4. Анализ на преживяемостта ……...15
3.6.5. Каплан- Майер (Kaplan- Mayer) криви на преживяемост ……..15
3.6.6. Анализ на ROC кривите за определяне на диагностична точност на изследваните биомаркери ……..……15
3.6.6.1. Анализ на ROC кривите на единични биомаркери ……..…….16
3.6.6.2. Мултимаркерен анализ на ROC кривите ……..16
3.7. Използвана апаратура ……16
IV. Резултати ……...17
4.1. Резултати от валидирането на ION Torrent технология за следващо поколение секвениране на BRCA1 и BRCA2 ……17
4.1.1 Подготовка на библиотеките и секвениране……... 18
4.1.2 Анализ на покритието и детекция на вариантите……..... 19
4.1.3 Валидиране на вариантите ……....21
4.1.4 Открити варианти ……...22

4.2. Резултати от генетичния анализ на 94 тумор-асоциирани гена с MiSeq новогенерационна система ……24
4.3. Резултати от генетичния анализ на соматични мутации с MiSeq новогенерационна система в тумори на български пациентки с рака на гърдата ……26
4.4. Резултати от изследванията на циркулиращи туморни клетки при болни с метастазирал рак на гърдата ……..31
4.4.1 Таргетна популация пациентки и критерии за включване ……31
4.4.2 Резултати от качествения анализ на ЦТК ……...31
4.4.3 Резултати от количествен анализ на експресията на молекулните маркери hMAM, CK-19, CD44 и CD24 в ЦТК от периферна кръв посредством Real Time RT-PCR ……...37
V. Обсъждане на получените резултати ……..……44
5.1 Валидиране на Ion Torrent PGM секвениране на гените BRCA1 и BRCA2 ……44
5.1.1. Анализ на покритието и откриване на варианти ……...44
5.1.2. Валидиране на вариантите ……..45
5.1.3. Сравнение на протоколите за подготовка на библиотеките ……45
5.1.4 Приложение на платформата в диагностичното секвениране ……..46
5.2 Следващо поколение секвениране на 94 тумор-асоциирани гена при BRCA негативни пациентки с рак на гърдата ……...47
5.2.1 ATM ……47
5.2.2 MUTYH ……..48
5.2.3 CHEK2 ……48
5.2.4 PTCH1 ……49
5.2.5 RAD51C ……..49
5.2.6. MET ……...49
5.2.7 WRN ……...50
5.2.8 ERCC4 ……50
5.2.9 PALB2 ……50
5.2.10 PRF1 ……51
5.2.11 RET ……...51
5.2.12 SDHB ……51
5.2.13 AIP.. ……..52
5.3 Анализ на соматични мутации в тумори на пациентки с рак на гърдата с MiSeq платформа за следващо поколение секвениране ……53
5.3.1 PIK3CA ……...53
5.3.2 ERBB2 ……54
5.3.3 ERBB4 ……54
5.3.4 APC ……55
5.3.5 ATM ……55

5.4 Анализ на резултатите получени при изследването на циркулиращи туморни клетки при пациенти с метастазирал рак на гърдата ……57
5.4.1 GA733-2 ……..58
5.4.2 MUC1 ……..58
5.4.3 HER2 ……...59
5.4.4 CD24 ……...60
5.4.5 Цитокератин 19 ……61
5.4.6 Човешкият мамаглобин ……61
VI. Изводи ……...…63
VII. Приноси ……..…64
VIII. Публикации и участия в конгреси и проекти ……....65
8.1. Публикации свързани с дисертационния труд ……...65
8.2. Участия в конгреси ……..66
8.3. Участия с проекти ……68
IX Библиография ……..…….69
Приложение 1 ……79

I. Въведение

Ракът на гърдата е първото по честота злокачествено заболяване сред жените в световен мащаб. По последни данни на Националия Раков Регистър за 2012 година в България ракът на гърдата е на първо място по честота при жените и представлява 26.4% от всички злокачествени заболявания при тях. Най-честата причина за смърт от злокачествени заболявания при жените в България е рака на гърдата - 18,3%. През 2012 г. са регистрирани 3923 нови случаи и са починали 1364 жени. Заболяемостта от рак на млечната жлеза се увеличава с 1.8% средногодишно, смъртността остава без статистически значима промяна.

Увеличената заболеваемост от рак на гърдата определя и нуждата от осъвременяване на клиничните и молекулярно-генетичните средства за диагностициране, лечение и проследяване на заболяването. Съществуват множество молекулярно-генетични тестове за откриване на мутации в гените. Към днешна дата за златен стандарт при търсенето на мутации се смята директното секвениране по Sanger. Лимитиращи фактори при този метод са неговата трудоемкост, времеемкост и цена, което наложи в много лаборатории да се въведе алтернативен метод, който да бъде по-бърз, по-евтин и по-надежден. Това стана възможно благодарение на секвенаторите от ново поколение като Ion Torrent PGM и MiSeq платформите, които все повече навлизат в диагностиката на различни наследствени заболявания. Увеличената заболеваемост от рак на гърдата определя и нуждата от подобряване на подходите за дианостициране, лечение и проследяване на заболяването. Независимо от ранното откриване, близо една трета от болните ще развият метастатичен процес. В 30-40% от тези болни, циркулиращи туморни клетки могат да бъдат открити в периферната кръв. Съществува наистина интригуващ потенциал за подобряване на възможностите за определяне на прогнозата и мониториране на ефекта от адювантното лечение или лечението при метастазирало заболяване. Едновременно с това има възможности за определяне на биологични маркери, свързани с микрометастатичните клетки, които имат предиктивно значение при приложение на определен вид насочена терапия.

Настоящата разработка е първото изследване за въвеждане и валидиране на методи за новогенерационно секвениране за изследване на мутации в гени свързани с фамилен рак на гърдата и яйчника и за въвеждане на метод за изследване на соматични мутации и циркулиращи туморни клетки при пациенти с рак на гърдата с оглед оптимизиране и проследяване на терапията в България.

II. Цел и задачи

2.1. Цели

- Въвеждане и валидиране на методи за новогенерационно секвениране за изследване на мутации в гени свързани с фамилен рак на гърдата и яйчника

- Въвеждане на метод за изследване на соматични мутации и циркулиращи туморни клетки при пациенти с рак на гърдата с оглед оптимизиране и проследяване на терапията

2.2. Задачи

2.2.1 Валидиране на протокол за следващо поколение секвениране с платформа Ion Torrent PGM за гените BRCA1 и BRCA2

За изпълнението на тази цел в проучването бяха изпълнени следните задачи:

- Подбор на пациенти с рак на гърдата с информация за мутационния статус на гените BRCA
- Секвениране на пациентите за *BRCA1* и *BRCA2* гените на IonTorrent PGM платформата;
- Оптимизиране на алгоритъм за биоинформатичен анализ
- Сравнение на получените резултати със Sanger секвениране

2.2.2 Въвеждане на метод за бързо и надеждно диагностично изследване на панел от други гени, свързани с рак на гърдата при BRCA негативни пациентки и оценка на приноса на тези гени за предразположение към фамилен рак на гърдата

За изпълнението на тази цел в проучването бяха изпълнени следните задачи:

- Подбор на пациентки с фамилен рак на гърдата без мутации в BRCA гените за анализ с панел от други гени, свързани със заболяването.
- Секвениране на пациентките без мутации в BRCA гените с панел от 94 тумор-асоциирани гени с платформа MiSeq,Illumina
- Потърждение на резултатите със Sanger секвениране
- Анализ на резултатите

2.2.3 Определяне на спектъра на соматични мутации в 48 тумор-асоциирани гена с платформа MiSeq,Illumina

За изпълнението на тази цел в проучването бяха изпълнени следните задачи:

- Създаване на тъканна и ДНК биобанка от първични туморни тъкани на пациентки с рака на гърдата и събиране на клиничната информация за тях
- Секвениране на пациентките с панел от 48 тумор-асоциирани гени с платформа MiSeq,Illumina
- Биоинформатичен анализ на резултатите

2.2.4 Въвеждане на метод за проследяване на пациентки с метастатичен рак на гърдата преди и по време на терапията използвайки циркулиращи туморни клетки

За изпълнението на тази цел в проучването бяха изпълнени следните задачи:

- Подбор на пациентки с метастазирал рака на гърдата отговарящи на международните RECIST критерии и създаване на копиДНК банка
- Създаване на копиДНК банка чрез изолиране на кръвните проби от пациентките AdnaTest Breast Cancer Select
- Провеждане на качествен анализ за наличие на циркулиращи туморни клетки с маркери GA733-2, MUC1 и Her2
- Провеждане на количествен анализ за експресията на маркерите hMAM, CK19, CD24, CD44 с RT-PCR
- Статистически и биоинформатичен анализ на данните

III. Материали и методи

3.1. Валидиране на ION Torrent технология за NGS

3.1.1 Клиничен материал

В настоящето изследване бяха включени 58 пациентки с фамилен рак на гърдата, стриктно отговарящи на установените международни критерии за генетичен анализ на мутации в *BRCA* гените, утвърдени от Breast Cancer Linkage Consortium (BCLC), 1999 и National Comprehensive Cancer Network (NCCN), 2010 (1).

Пациентите бяха насочвани към Център по Молекулна Медицина от следните клинични звена:

- Катедра по обща и клинична патология, МУ/Клиника по обща и клинична патология, УМБАЛ „Александровска" с насочващ екип: проф. д-р Св. Христова, д-р Ал. Влахова и д-р Т. Диков;
- Клиника по онкология МБАЛ „Надежда" с насочващ екип: проф. д-р К. Тимчева, д-р С. Вълев и д-р М. Таушанова;
- II хирургична клиника „УМБАЛ „Царица Йоана – ИСУЛ" с насочващ лекар д-р Т. Седлоев;
- Клиника по обща и чернодробно-панкреатична хирургия, УМБАЛ „Александровска" с насочващ лекар д-р М. Василева.

3.1.2. Преаналитична обработка на биологичния материал

Необходимият биологичен материал, за целите на генетичния анализ беше високомолекулна ДНК, изолирана от периферна венозна кръв.

3.1.2.1. Изолиране на високомолекулна ДНК от кръв.

- Изолиране на високомолекулна ДНК по солевия метод на Miller (Miller SA et al, 1988).
- Изолиране на високомолекулна ДНК чрез CHEMAGEN® Magnetic Separation Station (ParkinElmer)

3.1.2.2. Оценка на качеството и количеството на изолираната ДНК

3.1.3. Аналитична обработка на биологичния материал

3.1.3.1. Намножаване на фрагменти ДНК чрез полимеразна верижна реакция (PCR – **P**olymerase **C**hain **R**eaction)

3. 1.3.2. Качествен контрол на PCR реакцията

3. 1.3.3. Хоризонтална агарозна електрофореза

3. 1.3.4. Директно секвениране

3.1.3.5. Секвениране от второ поколение посредством Ion Torrent PGM (**P**ersonal **G**enome **M**achine)

Съобразно заложените задачи ДНК библиотеките бяха конструирани посредством два различни протокола – Ion Xpress Plus gDNA Fragment Library Preparation и Ion AmpliSeq™ Library Preparation

А. Конструиране на ДНК библиотека с Ion Xpress Plus gDNA Fragment Library Preparation на 26 пациента от тренировъчната група (10 пациента) и първата валидационна група (16 пациента)

Б. Конструиране на ДНК библиотека с Ion AmpliSeq™ Library Preparation на 32 пациента от втората валидационна група

При Ion Torrent секвенирането, за разлика от други платформи за новогенерационно секвениране, като Illumina, не се използват оптични сигнали. Вместо това тук се детектират освободените от ДНК полимеразата H^+ йони. Както и при другите NGS платформи входящата ДНК или РНК е фрагментирана до около 200 bp.

3.2. Следващо поколение секвениране с панел от 94 тумор-асоциирани гени с платформа MiSeq, Illumina

3.2.1. Клиничен материал

В настоящето изследване бяха включени 31 пациентки с фамилен рак на гърдата, стриктно отговарящи на установените международни критерии за генетичен анализ на мутации в *BRCA* гените, за които имаме предварителна информация за мутационния статус спрямо двата гена и за които е доказано,че нямат патогенни мутации в тях.

3.2.2. Преданалитична обработка на биологичния материал

Необходимият биологичен материал беше високомолекулна ДНК, която е преминала всички етапи на генетична обработка.

3.2.3. Аналитична обработка на биологичния материал

3.2.3.1. Секвениране с помощта на готов панел TruSight Cancer и система MiSeq на Illumina**.** Секвенционният панел покрива кодиращите райони на 94 гени, за които се предполага, че имат роля в предразположението към рак, включително и гени, асоциирани с чести (рак на гърдата, колоректален рак) и по-редки видове рак. В допълнение, панелът включва 284 полиморфни варианти (SNP), асоциирани с предразположение към рак.

3.3 Анализ на спектъра от соматични мутации в тумори от български пациенти с рак на гърдата посредством MiSeq платформата за следващо поколение секвениране

3.3.1 Клиничен материал

Пациентите бяха насочвани към Център по Молекулна Медицина от следните клинични звена:

- II хирургична клиника „УМБАЛ „Царица Йоана – ИСУЛ” с насочващ лекар д-р Т. Седлоев;
- Клиника по обща и чернодробно-панкреатична хирургия, УМБАЛ „Александровска“ с насочващ лекар д-р М. Василева.

След подписване на информирано съгласие от пациентите, част от туморната им тъкан, отстранена по време на операцията, беше използвана за изолиране на високомолекулна ДНК, останалата част от туморната маса, както и екстрахираната ДНК, която не бе използвана в настоящото изследване, бяхасъхранени в ЦММ, според стандартната оперативна процедура за съхранение на биологични проби, за по нататъшни проекти. Събирането и съхранението на данните на пациентите бе осъществено в съгласие с приетите закони за защита и неприкосновеност на личната информация. Използвани бяха 91 туморни проби.

3.3.2. Преданалитична обработка на биологичния материал

Като биологичен материал в настоящото проучване беше използвана високомолекулна ДНК, изолирана от замразени на -80 ^{o}C в RNAlater 91 туморни проби, които са отеделени посредством ексцизионна биопсия. ДНК беше изолирана чрез дезинтеграция на част от туморната тъкан и кит QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, за ДНК екстракция на колонния принцип, според препоръките на производителя.

3.3.3. Аналитична обработка на биологичния материал

Беше проведено таргетно ресеквениране на панел от тумор-асоциирани гени TruSeq Amplicon-Cancer Panel (TSACP) на платформа за следващо поколение секвениране MiSeq (Illumina). TSACP съдържа оптимизирани олигонуклеотидни проби за секвенирането на мутационни горещи точки (hotspots) в над 35 килобазова таргетна геномна секвенция. В рамките на високо мултиплескна единична реакция, 48-те гена са представени от 212 ампликона.

3.4 Проследяване на циркулиращи туморни клетки при болни с метастазирал рак на гърдата

3.4.1. Клиничен материал.

Пациентите бяха насочвани към Център по Молекулна Медицина от следните клинични звена:

- Клиника по онкология МБАЛ „Надежда” с насочващ екип: проф. д-р К. Тимчева, д-р С. Вълев и д-р М. Таушанова;
- Клиника по медицинска онкология, Специализирана болница за активно лечение по онкология – ЕАД, София с насочващ екип: проф. д-р К. Тимчева, д-р С. Вълев и д-р М. Таушанова;

Като група, подходяща за проучването, се подбират пациентки, диагностицирани с метастатичен рак на гърдата, при които съществува поне една мерима лезия, според критериите на Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) и са показни за провеждане на първа линия химиотерапия. Пациентките получават информация за проучването и подписват информирано съгласие. В изследването са включени 43 пациентки и общо 12 контроли, от които 6 здрави пременопаузални и 6 здрави постменопаузални жени, без анамнеза за прекаран карцином на гърдата, за да се направи сравнение на нивата на експресия на специфичните за рак на гърдата туморни маркери в ЦТК от периферна кръв.

Оценката на заболяването, според установените критерии, е препоръчително да се прави през 3-4 курса. При доказана прогресия, на фона на провеждане на I линия, се инициира провеждане на II линия химиотерапия.

- **качествен анализ** на експресията на специфичните за рак на гърдата туморни маркери GA733–2, Muc-1 и Her-2, както и на β-actin като вътрешна контрола посредством AdnaTest Kit (AdnaGen, Langenhagen, Germany),

- **количествен анализ** на четири подбрани експресионни маркери hMAM, CK-19, CD44, CD24 с помощта полимеразна верижна реакция в реално време

Оценката на нивата на ЦТК се извършвана в три точно дефинирани точки (1) диагностициране на метастазирало заболяване, преди започване на първа линия химиотерапия, 2) след проеждане на III курс химиотерапия, и 3) след провеждане на VI курс химиотерапия. Отговорът на заболяването спрямо провежданото лечение се оценява по общоприетите критерии за оценка след трети и шести курс химиотерапия, заедно с определяне на нивото на ЦРК.

3.4.2. Преданалитична и аналитична обработка на биологичния материал

3.4.2.1. Събиране на кръвни проби

Венозната кръв от пациентките се събира в специални епруветки за кръв , които задължително се използват за анализ с готовия AdnaGen Test

3.4.2.2. Изолиране и обогатяване на циркулиращи туморни клетки- AdnaTest BreastCancerSelect

AdnaTest BreastCancerSelect е разработен за изолиране и обогатяване на циркулиращи туморни клекти от периферната кръв на пациенти с рак на гърдата. Препоръчва се последващ експресионен анализ чрез AdnaTest BreastCancerDetect.

3.4.3 Аналитична обработка на биологичния материал

3.4.3.1. Изолиране на иРНК и качествен анализ- AdnaTest BreastCancerDetect

AdnaTest BreastCancerDetect съдържа Oligo (dT)25-лигирани магнитни частици за изолирането на иРНК от лизата, приготвен както е описано по-горе. Така изолираната иРНК се преобразува в копиДНК и се анализира качествено с мултиплексен PCR. Праймерите в кита позволяват амплифициране на няколко тумор сепцифични маркера за качествения анализ за наличие на туморни клетки. Фрагментите са със следната дължина:

GA733-2: 395 бд
Muc-1: 299 бд
Her-2: 265 бд
Actin: 120 бд (като вътрешна контрола)

Резултатите се смятат за положителни ако даден PCR фрагмент от поне един от тумор-асоциираните маркери е позитивен с пик над ≥ 0.15 ng/µl. Заложената вътрешна контрола Актин трябва да е налична при всички изследвани проби. Той показва успешно изолиране на клетките, обратна транскрипция и мултиплексен PCR.

3.4.3.2. Количествен анализ на експресията на молекулните маркери hMAM, CK-19, CD44 и CD24 в периферна кръв посредством Real Time RT-PCR

Бяха използвани готови праймери за амплификация на – QuantiTect Primer Assay (Qiagen) съответно за следните гени- hMAM, CK-19, CD44, CD24 като вътрешна

контрола на реакцията беше подбран гена ACTB, в съчетание с QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen).

3.5 Биоинформатичен анализ на получените резултати

3.5.1. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от директното секвениране. При анализа на получените резултати бяха използвани следните софтуерни програми: *FinchTV. SeqScape, CodonCode Aligner u Sequncing Analysis.*

3.5.2. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от секвенирането от ново поколение с Ion Torrent PGM: *NextGene*

3.5.3. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от секвенирането от ново поколение с MiSeq: *Illumina VariantStudio Data Analysis Software, Variant Effect Predictor (VEP)*

Информацията за асоциация с известно заболяване на дадения вариант получава от следните бази данниCatalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC), ClinVar и Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), чрез ClinVar база данни. Ресурси като dbSNP, Ensembl, 1,000 Genomes Project и Exome Variant Server предоставят информация за наличието и честотите на дадените варианти в популацията.

Вариантите, които не преминават филтъра за качество на секвенирането и не се дефинират като "PASS" при анализа за герминативни мутации с панела TruSight Cancer за 94 тумор-асоциирани гена се определятт като едно от следните:

- LowVariantFreq - честота < 5% (< 1% за панела TruSec Amplicon Cancer Panel
- LowGQ - качество на генотипиране < 30 (което е шанс за false positive > 0.001)
- R8 - за indel броят на съседните повтори (повторения на индела) е > 8
- LowDP - дълбочина (total coverage) < 20
- SB - дисбаланс в прочитите в едната и другата посока

3.6. Статистически анализ на получените резултати

3.6.1 SPSS v17.0 (Windows). За сравнение на разпределението на дискретните клинични и биологични характеристики на изследваните подгрупи болни беше използван Fisher's exact test. Общата преживяемост (ОП) беше изчислена от датата на поставяне на диагнозата до датата на настъпване на смъртта. Продължителността на ОП беше анализирана посредством метода на Kaplan-Meier, като различията между отделните групи пациенти статистически бяха оценени чрез log-rank теста. За ниво на статистическа значимост бе приета стойност на $p<0.05$.

3.6.2. Нулева хипотеза (H_O)

3.6.3. Метод χ^2

3.6.4. Анализ на преживяемостта

3.6.5. Каплан- Майер (Kaplan- Mayer) криви на преживяемост

3.6.6. Анализ на ROC кривите за определяне на диагностична точност на изследваните биомаркери

3.6.6.1. Анализ на ROC кривите на единични биомаркери.

3.6.6.2. Мултимаркерен анализ на ROC кривите

3.7. Използвана апаратура

- Автоматизирана система за изолиране и пречистване на ДНК и РНК - Модел: Chemagen, Magnetic Separation Module I;
- Хомогенизатор - ULTRA-TURRAX T10 basic Dispenser (IKA);
- Термоблок ThermoE (Bioer);
- ABI PRISM ® Автоматичен ДНК секвенатор- модел 3130xl;
- Апарат за PCR в реално време, Модел: 7900 HT Fast Real-time PCR, блок за 384 проби;
- Апарати за PCR амплификация: градиентен PCR апарат- Модел: QB-96 на QUANTA BIOTECH; Bioer XP-F Cycler модел TC XP-A; AB Veriti Thermal Cycler;
- Вана за хоризонтална електрофореза (Science-Plus-UK);
- Токоизправител (Science-Plus-UK);
- Фотодокументационна система и UV-трансилюминатор с дължина на вълната 312 nm (MiniBisPro-Bio Imaging Systems);
- Спектрофотометър ND 1000 (NanoDrop);
- Ion Torrent Personal Genome Machine за секвениране от ново поколение;
- Ion One Touch System;
- MiSeq система за следващо поколение секвениране на Illumina
- Agilent 2100 Bioanalyzer;
- Хладилна центрофуга 5810R – модел Ependorf за целите на ДНК изолирането - Универсална центрофуга - модел: Eppendorf 5810 за преутаяране на пробите за секвениране
- Унивесална центрофуга Micro 200 – модел Hettich;
- Универсална центрофуга - модел: HERMLE Z383, 5000rpm
- Микроцентрофуга >15500 x g за 1,5 и 2,0 ml епроведки;
- Микроцентофуга за чипове MiniStar Silverline;
- Вортекс за разбъркване Press-to-mix (Snijders);
- pH метър (InLab);
- Магнитна бъркалка (Fisher Scientific);
- Магнитен статив за пречистване на пробите при ДНК изолирането;
- Магнитен статив DynaMaga™- за пречистване на пробите при NGS; - pH Meter;
- Магнити за работа с циркулиращи туморни клетки- DynaMag-S и DynaMag-L
- Едноканални пипети с обем: 0.5 – 10 µl, 2 – 20 µl, 20 – 200 µl и 100- 1000µl;
- Многоканални пипети с обем: 0.5 – 10 µl, 2 – 20 µl и 20 – 200 µl;

IV. Резултати

4.1. Резултати от валидирането на ION Torrent технология за следващо поколение секвениране на BRCA1 и BRCA2

Пациентките бяха разделени в три групи- тренировъчна група 1 (10 пациентки) с известни мутации в двата гена и две валидационни групи за проверка на специфичност и чувствителност на методиката, както и за сравнение на два различни метода за конструиране на библиотеките. Валидационните групи бяха 2, анализирани в 4 независими ръна, съответно съставени от 16 (Група 2),8 пациенкти и два ръна с 12 пациента (Група 3). Групите са разделени според метода, който е използван за подготовка на библиотеките.

За да определим ефективността на платформата използвахме пациентки за тренировъчната група, които да имат различни видове генетични варианти- инсерции и делеции на една или няколко бази, както и единични нуклеотидни варианти (Single Nucleotide Variants-SNV) намиращи се в нормални и в хомополимерни участъци на гена. Имащи обща дължина на нуклеотидната последователност двата BRCA гена са подходящ модел за изследване на точността, чувствителността и специфичността на настолната NGS платформа ION Torrnet PGM. Набора варианти в тренировъчната група пациенти не са всички възможни, които биха могли да съществуват в двата гена. Въпреки това са представителни за всички открити до сега варианти и мутации в тези гени, изследвани при 200 Български пациентки в Център по Молекулна Медицина до момента чрез Санджер секвениране. Пробите, които използвахме за да тестваме AmpliSeq^{TM} протокола за подготовка на библиотеките също бяха третирани като валидационна група. Тренировъчната група от 10 пациента, предварително секвенирани за анализ на мутационния статус на двата гена има 7 различни патогенни мутации от типа промяна на рамката на четене (frameshift). В подбраната група пациентки бяха наблюдавани общо 35 различни вида варианти: 7 патогенни мутации от типа изместване на рамката на четене (frameshitf), 10 варианта от тип промяна на смисъла (missense), 8 синонимни замени (syn), 2 варианта в UTR регионите и 8 интронни варианта (IVS) (Таблица 1). Всички пациенти бяха секвенирани както по метода на Санджер, така и с платформата за следващо поколение секвениране.

Таблица 1. Подбрани варианти в BRCA1/2 гените за потвърждение с NGS метод

Ген	Екзон	dbSNP	Тип на мутация	Пациенти №
BRCA1	8	-	Frameshift	BC134
BRCA1	20	rs80357906	Frameshift	BC006;BC017
BRCA2	11n	rs80359531	Frameshift	BC058;BC076
BRCA2	11n	rs80359544	Frameshift	BC052
BRCA2	11n	rs80359550	Frameshift	BC090
BRCA2	17	rs80359687	Frameshift	BC019A
BRCA2	27a		Frameshift	BC024
BRCA2	10	rs766173	Missense	BC024*;BC052
BRCA2	10	rs144848	Missense	BC017;BC019A;BC020;BC058;BC090
BRCA2	11	rs1799944	Missense	BC017;BC020
BRCA1	11b	rs1799950	Missense	BC006;BC020;BC090
BRCA1	11e	rs4986850	Missense	BC019a;BC020;BC134

BRCA1	11g	rs799917	Missense	BC019a;BC020*;BC134
BRCA1	11i	rs16941	Missense	BC019a;BC020;BC134
BRCA1	11J	rs16942	Missense	BC019a;BC020;BC134
BRCA1	11L	-	Missense	BC020
BRCA1	16	rs1799966	Missense	BC019a;BC020;BC076*BC134
BRCA1	11e	rs1799949	Silent	BC019a;BC020;BC134
BRCA1	11f	rs16940	Silent	BC017*;BC020;BC024*
BRCA1	13	rs1060915	Silent	BC019a;BC020;BC134
BRCA2	10	rs1801439	Silent	BC017;BC020
BRCA2	11	rs1801499	Silent	BC017;BC020
BRCA2	11e	rs1801406	Silent	BC052;BC090
BRCA2	11g	rs543304	Silent	BC006*;BC017;BC019A;BC020;BC134
BRCA2	14	rs1799955	Silent	BC052;BC090
BRCA2	27c	rs15869	UTR-3	BC017;BC019A;BC134
BRCA2	2	rs1799943	UTR-5	BC017;BC052;BC090;BC134
BRCA1	7	rs147856441	IVS	BC019a; BC134
BRCA1	8	rs799923	IVS	BC020;BC024;BC52;BC058;BC076
BRCA1	9	rs8176144	IVS	BC019a;BC020;BC134
BRCA1	15	rs8176212	IVS	BC019a;BC020;BC134
BRCA2	4	rs11571610	IVS	BC020
BRCA2	5	rs3783265	IVS	BC020
BRCA2	8	rs2126042	IVS	BC134
BRCA2	13	rs11571680	IVS	BC020

* *със звезда са означени индивидите, хомозиготни по дивия алел.*

4.1.1 Подготовка на библиотеките и секвениране.

Всички секвенционни рънове на всяка от групите пациенти са обобщени в таблица 2. Голяма част от рънovете проведени с библиотеката Ion XpressTM не се картираха на района, който ни интересува (ROI). Вероятна причина за това е метода на фрагментиране посочен в протокола на метода. Вероятно има по-къси фрагменти, които излизат извън района, който ни интересува. Тези рънове също така показаха и много висок процент поликлонални прочети, което намалява общия процент прочети (On-target). Група 3 беше преминала идопълнителен качествен контрол на генерираните ISPs с Qubit 2.0 флуориметър и кит за кач1ествен контрол. Резултатите показаха достатъчни нива на обогатяване на частиците (съответно за трите групи-22.3%, 14.3% и 13.8%) за да бъдат успешно секвенирани с платформата. Всяка показа ниски нива на поликлоналност (17-22%) и фракция на некартирани фрагменти от 0.2-0.3%. Всички пациенти имат по-малко от 5.5% прочети извън района на гените.

Таблица 2. Обобщение на параметрите получени при секвенирането на групите пациенти.

Рън	Chip	Брой проби	Кит за библиотеки	Прочети	Средна дължина	On-target прочети (%)
Тренировъчна	316	10	Ion Xpress	669 k	87	41.7
Валидационна 1	316	16	Ion Xpress	1.49 M	128	54.1
Валидационна 2	314	8	AmpliSeq™	484 k	154	96.0
Валидационна 3	316v2	12	AmpliSeq™	3.9 M	163	97.4
Валидационна 4	316v2	12	AmpliSeq™	3.98 M	163	97.1

4.1.2 Анализ на покритието и детекция на вариантите

Процентът покритие на районите от интерес (ROI) беше калкулиран използвайки филтриране на вариантите с покритие 1X и 30X. Резултатите са обобщени в Таблица 3. Всички райони с покритие под 30x покрити бяха премахнати от статистическите изчисления и бяха секвенирани по метода на Санджер.

Рън (Група)	1x покритие (%)	30x покритие (%)	Филтрирани варианти (%)	Средно покритие
Training (1)	92.4	53.6	46.4	51 x
Validation1 (2)	94.3	76.1	23.9	117 x
Validation2 (3)	99.1	98.0	2	370 x
Validation3 (3)	99.5	98.0	2	2106 x
Validation4 (3)	99.5	95.8	4.2	2156 x

Таблица 3. Обобщение на покритието на отделните рънове.

Както се очаква от платформата повечето от фалшиво позитивните варианти (10 от 15) бяха делеции или инсерции. Увеличавайки необходимото покритие до 30x намаляха броя фалшиво позитивни и фалшиво негативни реазулати (Таблица 4), но също така и общия брой на открити варианти. След анализа на данните с 30x покритие се откриха 4 фалшиво позитивни варианти в тренировъчната група, всеки от които се открива в хомополимерен участък или с много ниска честота в кодиращи райони на ROI.

Таблица 4. Параметри на откритите варианти с приложените биоинформатични програми.

	NextGENe		Torrent server (TS)		NextGENe и TS	
Граница на покритие	3x	30x	3x	30x	3x	30x
FN (TP+FN)	9 (106)	0 (49)	10 (106)	3 (49)	9 (106)	0 (49)
FP	1081	638	73	36	15	4
Чувствителност (%)	91.5	100.0	90.6	93.9	91.5	100.0
Специфичност (%)	80.4	82.6	90.2	92.5	96.4	98.3
Positive predictive value (%)	8.2	7.1	56.5	56.1	86.6	92.5
Negative predictive value (%)	56.5	100.0	98.6	99.3	97.8	100.0

FN- фалшиво позитивни, FP- фалшиво позитивни, TP-истински позитивни варианти

Пробите от тренировъчната група имат средно покритие от 51x с липсващи секвенирани фрагменти в рамките на 7.6%. С покритие минимум 30x бяха 49 варианта. Всички те бяха детектирани чрез биоинформатичния разработен подход и кореспондират на 100% чувствителност и 98.3% специфичност (Таблица 5). Десет от вариантите, включително и фалшиво позитивните, са делеции и инсерции и съставляват 19% (10/53) от всички открити варианти. Всички са хетерозиготни с изключение на 1 (32906729, A>C), който се открива в хомозиготно състояние в един от пациентите и в хетерозиготно в четири други.

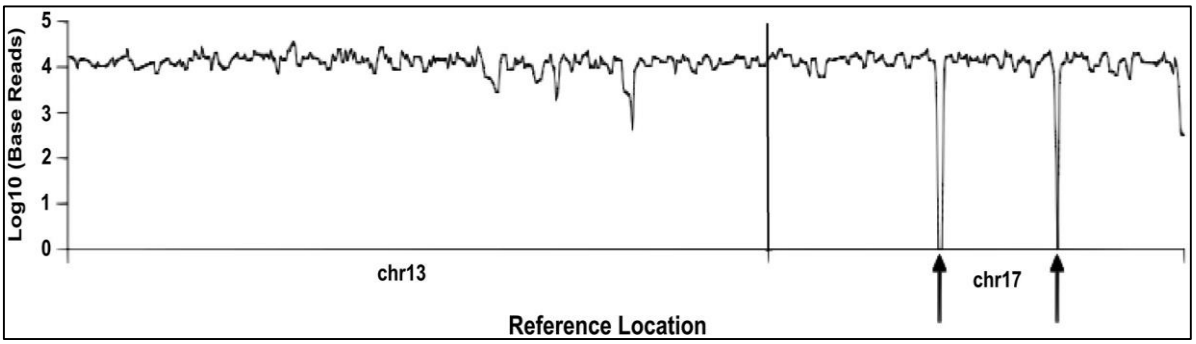
Таблица 5. Резултати получени с биоинформатичния алгоритъм за детекция на вариантите.

Група	Тренировъчна		Валидационна		
	Ion Xpress™	Ion Xpress™	AmpliSeq™	AmpliSeq™	AmpliSeq™
Проби	10	16	8	12	12
TP/TP + FN	49/49	200/204	113/118	146/146	141/141
FP (SNV/indels)	0/4	6/31	2/10	7/0	6/0
Sensitivity (%)	100.0	98.0	95.8	100.0	100.0
(CI 95)	(92.7–100)	(95.1–99.2)	(90.5–98.2)	(97.4–100)	(97.3–100)
Specificity (%)	98.3	94.5	93.3	97.6	97.7
(CI 95)	(95.6–99.3)	(92.6–96.0)	(88.6–96.1)	(95.0–98.8)	(95.0–98.9)

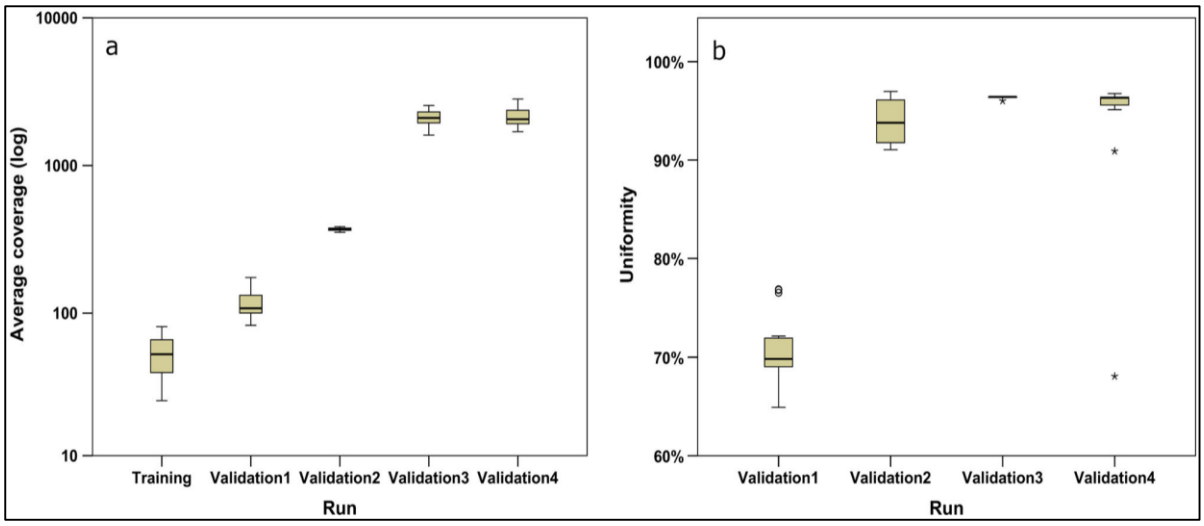
CI- доверителен интервал, FN- фалшиво негативни, FP- фалшиво позитивни, SNV-еднонуклеотидни варианти, TP истински позитивни

В група 3 дълбочината на покритие беше по-висока – от 370x до 2100x а пропорцията на липсващите участъци падна на 1%. Тези участъци липсват и в останалите три ръна (Фиг 1). Въпреки,че общото покритие е много по-уеднаквено и високо в тези три ръна (Фиг 2), не се откри разлика в броя покрити нуклеотидни бази при настройка на параметрите от 3x и 30x и вариантите получени при тези дълбочини са практически едни и същи. Открити бяха 424 варианта в 52 различни локуса. ПОлучените делеции и инсерции бяха 19 (7 локуса) а по-голямата част (12 от 19) се картираха в интронни райони в близост до екзон 7 на BRCA1 гена. Тези често срещащи се варианти, вариращи от един до четиринайсет нуклеотида са разпределени в почти всички проби от първия рън на третата група (8 проби), докато никоя от пробите в

останалите два ръна на група 3 не показаха наличие на варианти в този район. След като премахнахме тези варианти като фалшиво позитивни група 3 показа значително намаление на общия брой варианти в сравнение с другите две групи (p<5e-7).



Фигура 1. Представителна графика на покритието при трите AmpliSeq ръна от група 3. Оказани със стрелки са два ниско покрити района на хромозома 17 (BRCA1 гена).



Фигура 2. Сравнение между покритиети (а) и еднаквостта на покритието (б) в различните рънове.

4.1.3 Валидиране на вариантите

Само два от рънoвете показват чувствителност под 100%. В първия валидационен рън четирите липсващи варианта бяха с много ниско покритие. Втория валидационен рън показа наличие на 5 фалшиво позитивни варианта, два от които (и двата са делеция на TTAA в хромозомна локализация 13:32915413) бяха филтрирани поради силен дисбаланс в покритието. Това може да се обясни с позиционирането на варианта в последния ампликон на екзон 11 на BRCA2 гена, които няма припокриване със съседен ампликон. Открити бяха общо 62 фалшиво позитивни варианта при всички валидационни групи. Делециите и инсерциите съставляват 66% (41/62) от тях и се срещата само в първите два валидационни ръна, като 12 от тях се намират в повтор на екзон 7 на BRCA1 гена. Останалите са делеции в хомополимерни области от 2,3 или 4 нуклеотидни бази и една инсерция на гуанин в края на един от ампликоните. Наблюдава се чест вариант (delC в chr13:32972389) при 11 пациентки от първи

валидационен рън (69% от пробите на ръна)Нито един от горезиброените варианти не се потвърди със секвенирането по Санджер. От всички 21 варианта на заместне на една база с друга 5 се срещаха в 30% от прочетите. Останалите 15 варианта се откриват с високо покритие и добър баланс на прочетите с честоти близо 50% (хетерозиготни) или 100% (хомозиготни), но не се потвърждават със секвениране по Санджер. Тези варианти се срещат само в AmpliSeq рановете и представляват 100% от фалшиво позитивните нуклетидни замени в тях. 13 от тези варианти са синонимня замяна в различните пациенти- rs16940 (L771L в BRCA1 гена). Най-ниската честота за откриване на фалшиво позитивни варианти беше изчислена на 10%. Базирайки се на границата за откриване на варианти по разработения биоинформатичен алгоритъм за минимален абсолютен брой прочети на даден вариант (7 прочета за Torrent Suit софтуера и 3-5 прочета за NextGENe софтуера) беше установено,че минимум покритие от 70x ще осигури откриване на всички варианти като 10% (7 прочита) покриват изискванията и на двата алгоритмични филтъра.

4.1.4 Открити варианти

Общо 59 варианта бяха открити със следващо поколение секвениране и потвърдени със Санджер секвениране при всички валидационни рънове: 14 сининомни варианта, 3 варианта от типа frameshift. 21 миссенс замени една от които водещи до стоп кодон, 2 варианта в 3‘ и 5‘ областите, 18 интронни варианта един от които в донорното място за сплайсинг на интрон 12 (Таблица 6). Не се срещат в литературата до сега два от frameshift вариантите, една миссенс и два други интронни варианта. Новооткритите варианти от валидационните сетове са показани в Таблица 7.

Таблица 6. Списък на откритите и потвърдени варианти в изследването

Gene	Exon	Position	dbSNP ID	HGVS	Type[a]
BRCA1	22	41201142		c.5396_5402delCCCTTGG	Frameshift
	18	41216021	rs8176258	c.5075-53C>T	IVS
	16	41222975	rs1799967	c.4956G>A	Missense
	16	41223094	rs1799966	c.4837A>C	Missense
	13	41234470	rs1060915	c.4308T>C	Silent
	11L	41243509	rs28897689	c.4039A>G	Missense
	11j	41244000	rs16942	c.3548A>G	Missense
	11i	41244429	rs4986852	c.3119G>A	Missense
	11i	41244435	rs16941	c.3113A>G	Missense
	11g	41244936	rs799917	c.2612C>T	Missense
	11g	41245103		c.2445T>C	Silent
	11f	41245237	rs16940	c.2311T>C	Silent
	11f	41245333	rs56329598	c.2215A>T	Missense
	11e	41245466	rs1799949	c.2082C>T	Silent
	11e	41245471	rs4986850	c.2077G>A	Missense
	11e	41245530	rs80357626	c.2019delA	Frameshift

	11b	41246481	rs1799950	c.1067A>G	Missense
	8	41251931	rs799923	c.442-34C>T	IVS
	7	41256101	rs147856441	c.441+36_441+38delCTT	IVS
	6	41256878	rs80358113	c.301+7G>A	IVS
	2	41276061	rs80356929	c.53T>C	Missense
	2	41276247	rs3765640	c.-19-115T>C	IVS
BRCA2	2	32890572	rs1799943	c.-26G>A	UTR-5
	4	32899388	rs11571610	c.425+67A>C	IVS
	4	32899468	rs4942423	c.425+147G>T	IVS
	8	32903685	rs2126042	c.681+56C>T	IVS
	10a	32906480	rs766173	c.865A>C	Missense
	10a	32906729	rs28897706	c.978C>A	Missense
	10c	32906980	rs1801439	c.1365A>G	Silent
	10d	32907407	rs28897710	c.1792A>G	Missense
	11a	32910328	rs2320236	c.1910-74T>C	IVS
	11a	32910351	rs11571651	c.1910-51G>T	IVS
	11a	32910721	rs1801499	c.2229T>C	Silent
	11d	32911463	rs1799944	c.2971A>G	Missense
	11e	32911888	rs1801406	c.3396A>G	Silent
	11g	32912299	rs543304	c.3807T>C	Silent
	11h	32912560	rs28897724	c.4068G>A	Silent
	11i	32912830		c.4338T>C	
	11i	32913055	rs206075	c.4563A>G	Silent

Таблица 7. Списък на новооткритите и потвърдени варианти в изследването

Gene	Exon	Position	Variant	Type
BRCA2	11i	32912830	T>C	Synonymous
	12	32918791	G>A	Intronic[a]
	13	32921146	C>T	Intronic
	22	32953732	G>A	Intronic[c]
	27a	32972332	delA	Frameshift[c]
BRCA1	22	41201142	delCCAAGGG	Frameshift
	11g	41245103	T>C	Synonymous
	2	41276061	T>C	Missense[b,c]

a Intron donor pair variant, b New variant of rs80356929, c Variants that appeared in dbSNP during the revision process

4.2. Резултати от генетичния анализ на 94 тумор-асоциирани гена с MiSeq новогенерационна система

Вследствие на проведеното новогенерационно секвениране с панел от 94 тумор-асоциирани гени, очаквано суровите данни под формата на делеции и инсерции на една до няколко нуклеотидни бази, така и еднонуклеотидни замени, наброяват средно 297 варианта на пациент. Това голямо количество информация трябва да бъде филтрирано спрямо определени параметри за качество и дълбочина на покритието, за да се минимизира вероятността от попадане на фалшиво позитивни или фалшиво негативни резултати свързани с текущия анализ

След прилагане на критериите описани в точка 4.5.3. „Материали и Методи“ за качество и ефект, резултатите показаха наличието на следните патогенни и вероятно патогенни варианти в 11 пациента. Откритите мутации са обобщени в таблица 8:

- 1 нова frameshift мутация в гена ATM;
- 6 нови вероятно патогенни миссенс мутации в гените PTCH1, RAD51C, MET, MUTYH, ATM и CHEK2;
- 7 докладвани в литературните източници патогенни миссенс варианти в гените WRN, ERCC4, PALB2, PRF1, RET, SDHB и AIP;

Таблица 8. Открити патогенни и вероятно патовегенни варианти чрез панел за новогенерационно секвениране на 94 тумор-асоциирани гени при Български пациентки с рака на гърдата.

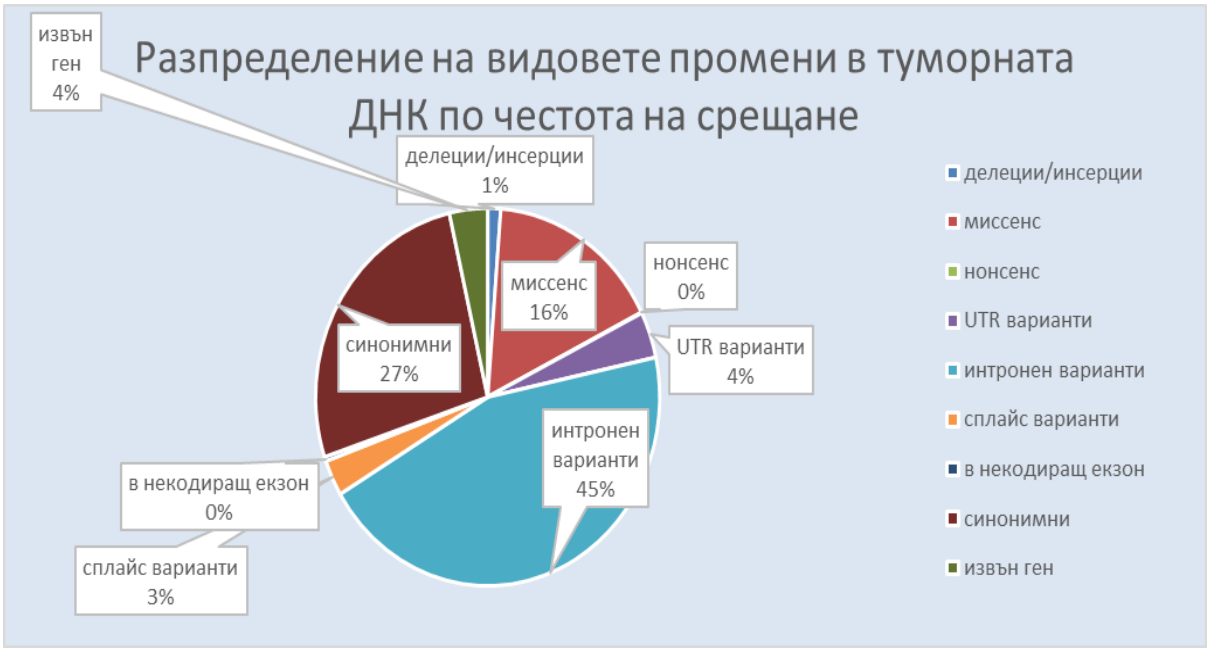
Ген	Нуклеотидна замяна	Аминокиселинна замяна	Подтип мутация	Засегнат белтъчен домен	rs номер
ATM	delC	p.Glu2139IlefsTer6	неизвестен frameshift вариант	FAT домен	-
MUTYH	c.797G>C	p.Ala266Gly (A266G)	неизвестен missense вариант; вероятно патогенен вариант	-	-
ATM	c.185G>T	p.Arg62Ile (R62I)	неизвестен missense вариант; вероятно патогенен вариант	-	-
CHEK2	c.1309G>A	p.Glu437Lys (E437K)	неизвестен missense вариант; вероятно патогенен вариант	-	-
PTCH1	c.1215 C>A	p.Pro369Thr (P369T)	неизвестен missense вариант; вероятно патогенен вариант	Извънклетъчен-топологичен домен	-
RAD51C	c.80T>G	p.Leu27Pro (L27P)	неизвестен missense вариант; вероятно патогенен вариант	Домен, необходим за т.нар Holliday junction resolution активност	-
MET	c.839G>T	p.Arg280Met (R280M)	неизвестен missense вариант; вероятно патогенен вариант	Sema домен; Извънклетъчен-топологичен домен)	-
WRN	c.1909C>T	p.Arg637Trp (R637W)	известен missense патогенен вариант	Хеликазен АТР-свързващ домен	rs148286708
ERCC4	c.1135C>T	p.Pro379Ser (P379S)	известен missense патогенен вариант	Хеликаза-подобен район	rs1799802
PALB2	c.2816T>G	p.Leu939Trp (L939W)	известен missense патогенен вариант	WD 2 повтор	rs45478192
PRF1	c.272C>T	p.Ala91Val (A91V)	известен missense патогенен вариант	MACPF домен	rs35947132
RET	c.2372A>T	p.Tyr791Phe (Y791F)	известен missense патогенен вариант	Протеин киназен домен	rs77724903
SDHB	c.379A>C	p.Ile127Leu (I127L)	известен missense патогенен вариант	2Fe-2S ferredoxin-ов домен	rs201372280
AIP	c.911G>A	p.Arg304Gln (R304A)	известен missense патогенен вариант	-	rs104894190

Описаните патогенни и вероятно патогенни мутации в таблицата се срещат при 11 (35.5%) от 31 пациентки като всяка от тях се среща само при един пациент. Три от пациентките носят по две мутации- пациентка № 124 (MUTYH 797G>C; SDHB 379A>C),пациентка № 125 (ATM 185G>T; AIP 911G>A) и пациентка № 209 (CHEK2 1309G>A; RET 2372A>T) и всяка от тях носи по една известна за базите данни и една нова мутация.

4.3. Резултати от генетичния анализ на соматични мутации с MiSeq новогенерационна система в тумори на български пациентки с рак на гърдата

В следствие на проведеното новогенерационно секвениране, суровите резултати набройват **5029** варианти, включващи както единични нуклеотидни замени (SNV), така и малки инсерции и делеции на една до няколко бази. Това голямо количество информация трябва да бъде филтрирано спрямо определени параметри, за да се минимизира вероятността от попадане на фалшиво позитивни или фалшиво негативни резултати свързани с текущия анализ. Средно на пациент без прилагане на филтрите за качество се откриват 55 броя варианти.

След прилагане на критериите за качество, приложихме допълнителен филтър от дълбочина на прочитите над 50, качество на генотипиране над 30 (което е шанс за false positive < 0.001,вероятността дадена база да е детектирана с вероятност за точност 99.9%) и честота на алтернативния вариант над 5%, резултатите показаха наличие на **1563** варианта в общия брой от 91 пациенти (в тази бройка се включва всяко едно мутационно събитие, напр. с. 345A>T в ген ATM се среща в 8 от пациентите и тя се смята като 8 мутационни събития (варианта) в изследвата група). Средно на пациент след прилагане на филтрите за качество се откриват 17 варианта. Направено беше и детайлно процентно разпределение на всички 1563 промени в гените според локализацията им и ефекта им върху белтъка (Фиг.3).



Фигура 3. Процентно разпределение на видовете промени в туморната ДНК по честота на срещане

Тъй като основата за инициране на канцерогенезата се определя от появата на и акумулирането на определени видове соматични мутации в туморсупресорни гени или в протоонкогени- т.нар. „driver“ (иницииращи) и „passengers“ (съпътстващи) мутации, за последващите анализи взехме в предвид само тези, които повлияват на функцията на белтъците, които кодират конкретните гени в панела- патогенните и вероятно патогенните варианти. Изключихме класовете като например синонимни варианти тъй като не представляват интерес за целите и задачите на дисертацията. Останаха общо

257 варианта (като се смята всяко едно мутационно събитие), които са общо 63 броя различни варианти. В изчисленията оставихме следните класове като ги разпределихме по видове мутации:

- frameshift инсерции и делеции- Има общо 19 варианта (отделни мутационни събития по честота на срещане в пациентите), разпределени в 3 гена, 6 различни вида варианти. Мутацията в ATM гена се среща най-често (12% от пациентите).

вид на мутацията	ген	вариант	брой пациенти
frameshift инсерции	HNF1A	NM_000545.5:c.863_864insC NP_000536.5:p.Pro289AlafsTer28	1
	PTEN	NM_000314.4:c.934_935insAC NP_000305.3:p.Lys313ThrfsTer5	1
frameshift делеции	PTEN	NM_000314.4:c.950_953delTACT NP_000305.3:p.Thr319Ter	1
	ATM	NM_000051.3:c.5228delC NP_000042.3:p.Thr1743LysfsTer13	11
	HNF1A	NM_000545.5:c.862delG NP_000536.5:p.Pro291GlnfsTer51	4
	HNF1A	NM_000545.5:c.865delC NP_000536.5:p.Pro291GlnfsTer51	1

- stop_gained

вид на мутацията	ген	вариант	брой пациенти
stop_gained	TP53	NM_000546.5:c.637C>T NP_000537.3:p.Arg213Ter	1

- миссенс- тази група е най-много бройна. Има общо 237 варианта (отделни мутационни събития в пациентите), 57 различни вида варианти разпределени в 25 гена,. Част от вариантите са с номер в dbSNP и са известни патогенни, друга част са вероятно патогенни според програмите за предикция SIFT и PolyPhen или са известни патогенни според COSMIC база данни (Таблица 9). От анализа са премахнати 2 варианта inframe миссенс делеции и всички, които са VUS. Бяха взети предвид само патогенните и вероятно патогенните мутации маркирани в червено на Таблица 9.

Таблица 9. Видове открити миссенс мутации при пациентите.

вид на мутацията	SIFT	Polyphen	Общ брой/ брой по вид	брой с rs №/ брой по вид	брой с Cosmic № брой по вид	патогенност
миссенс	deleterious	damaging	10/7	10/7	10/7	патогенни
			11/8	0/0	11/8	патогенни
			32/8	0/0	0/0	вероятно патогенни
		общо	54/23			
миссенс	tolerated	damaging	4/2	4/2	4/2	патогенни

			6/4	6/4	6/4	вероятно патогенни
			6/2	0/0	6/2	вероятно патогенни
			51/5	0/0	0/0	VUS
		общо	67/13			
миссенс	deleterious	benign	3/1	3/1	3/1	вероятно патогенни
			1/1	0/0	0/0	VUS
		общо	4/2			
миссенс	tolerated	benign	9/3	9/3	9/3	патогенни
			80/4	80/4	80/4	VUS
			1/1	1/1	0/0	VUS
			5/2	0/0	5/2	VUS
			13/6	0/0	0/0	VUS
		общо	108/16			
миссенс	-	-	2/1	2/1	2/1	вероятно патогенни
			1/1	1/1	0/0	VUS
		общо	3/2			
миссенс сплайс район	deleterious	damaging	1/1	1/1	1/1	патогенен
		общо	1/1			

След филтрирането им по патогенност според базите данни и програмите за предикция като оставихнме само патогенните и вероятно патогеннитеостават 105 патогенни и вероятно патогенни варианти, 44 различни по вид, разпределени в 17 тумор-асоциирани гена. Те са от по-голям интерес, защото именно „задвижващите“ мутации придават на раковата клетка предимство да нараства по-бързо от тези, които не носят мутацията и са подложени на позитивна селекция при еволюцията на рака.

✓ 1 **stop-gained (нонсенс) мутация**, която терминира транслацията на белтъка на мястото на възникване на мутацията;
✓ 6 различни вида **малки делеции/инсерции**, които също водят до изместване на рамката на четене (**frameshift**, FS) преждевремене стоп кодон и скъсен белтък;
✓ 21 известни в базите данни патогенни **миссенс мутации** (**missense**)
✓ 16 вероятно патогенни **миссенс мутации** (**missense**) според програмите за предикция или базите данни

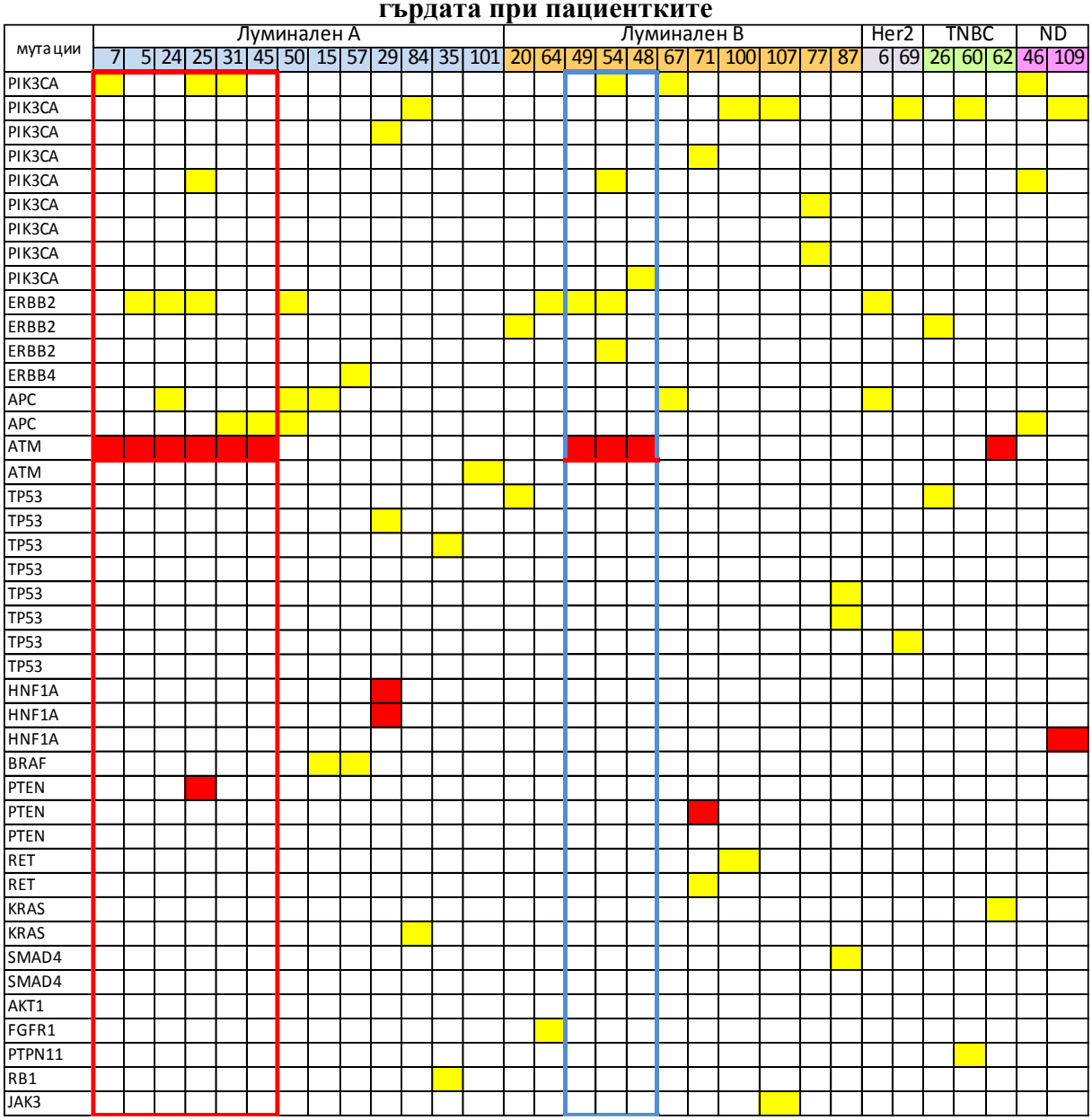
Пълният списък на 43 варианта, в 17 гена, наблюдавани при 60 пациента е показан в Приложение 1. Установихме, че патогенни мутации се откриват при 60 от изследваните 91 пациенти (65,8%). Освен известните патогенните мутации бяха открити и 11 нови за базите данни потенциално патогенни мутации в 46 пациента (78% от пациентите в които се открива патогенна мутация), спрямо направения in silico биоинформатичен анализ за предполагаемия им ефект върху белтъка, които са предпоставка за продължаване на научната разработка за изследване на ролята им в туморогенезата на рака на млечната жлеза. В следствие на анализа на резултатите беше направено разпределение на откритите патогенни и вероятно патогенни мутации според гените, в които се откриват. Установено беше, че патогенни мутации се

откриват в 35% от изследвания панел от гени. За да установим гените, които най-често биват засегнати от мутации в нашата група пациенти пресметнахме честотата на срещане на даден вид мутация в групата. Резултатите показват, че 70% от всички мутационни събития в тези гени се откриват в гените PIK3CA, ERBB2, APC, ATM и TP53. Степента на засягане на гените е показана на Фигура 4.



Фигура 4. Разпределение на гените според брой мутации, наблюдавани в изследваната група пациенти (общ брой наблюдавани мутационни събития

Таблица 10. Разпределение на мутациите сред различните подтипове рак на гърдата при пациентките



При разпределението на пациентите по подтиповете Луминален А, Луминален Б, тройно негативен и Her2 подтип и по мутации в гените от панела се разграничиха няколко групи с един и същ профил на мутациите. Премахнати бяха 60 пациентки, които носят само по една мутация в различни гени (Таблица 10):

- Първата група (оградена в червено) е в клъстера на Луминален А тип и се характеризира с наличието на една и съща frameshift мутация в ATM, и струпване на миссенс муации в гените PIK3CA, ERBB2 и APC, но липсват мутации в TP53
- Втората група (оградена в синьо) е в клъстера на Луминален Б тип и се характеризира със същата frameshift мутация в ATM гена, но има струпване на мутации вгените PIK3CA, ERBB2, но липсва както TP53 така и APC гена
- Третата група се открива в останалите пациенти от Луминален А и се характеризира с липсата на frameshift мутацията в ATM гена и наличие на мутации в PIK3CA, ERBB2, ERBB4, APC и имат мутации в TP53 и BRAF

- Четвъртата група се открива в останалите пациенти на Луминален Б тип и се характеризира с предимно миссенс мутации в PIK3CA, единични мутации в APC, TP53, PTEN и RET, но липсват мутации в ATM и BRAF

4.4. Резултати от изследванията на циркулиращи туморни клетки при болни с метастазирал рак на гърдата

4.4.1 Таргетна популация пациентки и критерии за включване.

В проучването бяха включени 43 пациентки, които отговарят на включващите критерии за Оценка на отговора на лечение при солидни тумори - Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST). Според тези критерии, за да е възможно отговорът да бъде оценен обективно, заболяването на даденият пациент трябва да е меримо. Само пациенти с меримо заболяване могат да бъдат включвани в изследвания, при които обективният отговор (ОО) е първична цел.

Като «**меримо заболяване»,** според RECIST, се дефинира заболяване, при което е налице поне една метастатична «**мерима лезия»**. Ако меримото заболяване е ограничено само в една мерима лезия, тя трябва да бъде верифицирана хистологично или цитологично. Лезиите се дефинират, като «**мерими»** ако в поне едно от измеренията диаметърът им надвишава 20 мм., при използване на конвенционален компютърен томограф (КТ) или надвишава 10 мм. при използване на спирален КТ. Повърхностните лезии (кожни лезии, палпируеми лимфни възли) също могат да бъдат мерими.

Контролна група. Като контроли за целите на експресионния анализ бяха използвани общо 12 здрави жени доброволци (5 пременопаузални и 7 здрави постменопаузални), без анамнеза за прекаран карцином на гърдата. Здравите жени също получиха информация за изследването и подписаха информирано съгласие. От тях еднократно бяха взети кръвни проби, които са обработени аналогично на пациентите за изолиране на ЦТК, респективно мРНК и синтез на кДНК. Част от тази ДНК бе използвана като отрицателна контрола при експресионните анализи, а останалата бе съхранена в биобанката на Центъра по молекулна медицина (ЦММ).

4.4.2 Резултати от качествения анализ на ЦТК

Оценката на нивата на ЦТК се извършва в три точно дефинирани точки: Установява се базисно ниво на ЦРК при: 1) диагностициране на метастазирало заболяване, преди започване на първа линия химиотерапия, 2) след провеждане на III курс химиотерапия – ден 63 от началото на терапията, и 3) след провеждане на VI курс химиотерапия – ден 126 от началото на терапията.

На всички пациентки беше събрана венозна кръв преди започване на химиотерапията за установяване на изходните нива на туморните маркери GA733-2, Muc-1 и Her-2. Резултатите са показани на таблица 11. На всяка от 12 здрави контроли беше взета венозна кръв и тествана за наличие на някой от маркерите. Всички здрави контроли бяха отрицателни по отношение на трите маркера за ЦТК.

Таблица 11. Резултатите от проведения качествен анализ на пациентите преди започване на съответната схема химиотерапия.

Проба ID	GA733-2	Muc-1	Her-2
CTC_001_01	не	не	не
CTC_002_01	не	не	не
CTC_003_01	не	не	не
CTC_004_01	+	+	не
CTC_005_01	+	+	не
CTC_006_01	не	не	не
CTC_007_01	не	не	не
CTC_008_01	+	+	не
CTC_009_01	+	+	+
CTC_010_01	не	не	не
CTC_011_01	не	не	не
CTC_012_01	+	не	не
CTC_013_01	не	не	не
CTC_014_01	+	не	не
CTC_015_01	не	не	не
CTC_016_01	не	не	не
CTC_017_01	+	+	не
CTC_018_01	+	+	+
CTC_019_01	не	не	не
CTC_020_01	не	не	не
CTC_021_01	не	не	не
CTC_022_01	не	не	не
CTC_023_01	не	не	не
CTC_024_01	не	не	не
CTC_025_01	+	+	+
CTC_026_01	не	не	не
CTC_027_01	не	не	не
CTC_028_01	не	не	не
CTC_029_01	не	не	не
CTC_030_01	не	не	не
CTC_031_01	не	не	не
CTC_032_01	+	+	+
CTC_033_01	не	не	не
CTC_034_01	не	не	не
CTC_035_01	не	не	не
CTC_036_01	не	не	не
CTC_037_01	не	не	не
CTC_038_01	не	не	не
CTC_039_01	не	не	не
CTC_040_01	не	не	не
CTC_041_01	не	не	не
CTC_042_01	не	не	не
CTC_043_01	не	не	не

При анализа на резултатите направени за изходното изследване на пациентките се установи, че 10 от тях (23.3 %) са позитивни за циркулиращи туморни клетки, като всички са позитивни за маркера GA733-2 (23%), 8 пациентки (18.6%) са позитивни за маркера MUC-1, а 4 от тях са позитивни за маркера Her-2 (9.3%).

При направения анализ на статуса на Her2 в първичния тумор и този на ЦТК на пациентките, за които има информация за първичния тумор (37 от 43, 86 %) се установи следното:

- 2 пациентки- CTC_009 и CTC_032 имат Her-2 негативен хистологичен резултат на първичния тумор, но имат Her-2 позитивен статус на ЦТК;
- 13 пациентки имат Her-2 позитивен хистологичен резултат на първичния тумор, но имат Her-2 негативен статус на ЦТК;
- 21 пациентки (58.1%) имат Her-2 негативен хистологичен резултат на първичния тумор и имат Her-2 негативен статус на ЦТК;
- 1 пациентка има Her-2 позитивен хистологичен резултат на първичния тумор и Her-2 позитивен статус на ЦТК;
- 6 пациентки нямат данни за Her-2 на първичния тумор и са изключени от сметките

След започване на първата линия химиотерапия беше събрана венозна кръв (второ посещение означено със „CTC_пациент №_02“ от 25 от проследяваните пациентки, като по време на курса химиотерапия не бяха проследени поради смъртта им общо 6 пациентки, а на останалите 12 не беше взета венозна кръв по други причини.Резултатите за нивата на туморните маркери GA733-2, Muc-1 и Her-2 и обективния отговор са показани .

Резултатите от проведения качествен анализ на 25 (58%) пациентки на второ посещение ни показаха, че спрямо маркера GA733-2 23 от тях 23 (92%) са негативни и 2 (8%) са позитивни. Спрямо маркера MUC-1 22 (88%) са негативни и 3 (12%) са позитивни . За статуса на Her-2 резултатите показаха, че само 1 пациентка е позитивна, а останалите 24 (96 %) са негативни. Циркулиращи туморни клетки се откриват при общо 3 от изследваните болни. Пациентка CTC_020_02 е позитивна и за трите маркера, пациентка CTC_024_02 е позитивна за GA733-2 и MUC-1, а CTC_032_02 е позитивна само за MUC-1.

При направеното сравнение между първите проби на болните и второто им посещение се установи, че CTC_020_02 и CTC_024_02 са били първоначално негативни и по трите маркера, но при второто вземане на кръв се появяват ЦТК. CTC_032_02 остава позитивна за наличието на ЦТК, но при второто посещение се наблюдава редукция в броя на експресираните маркери - само MUC-1. Всички останали пациентки не показват наличие на ЦТК на второ посещение, като при 20 се запазва негативния статус, а при 5 от болните изчезват откритите преди започване на химиотерапия експресионни маркери маркери и съответно ЦТК (CTC_004, CTC_005,CTC_008,CTC_017 и CTC_018). Измерванията на обективния отговор към лечението, към момента на на пробите от второ посещение беше възможно да бъде направено за 14 пациентки, за които разполагахме с достатъчно информация. От тях няма такива, които да са показали пълна ремисия на туморите и съответно терапията продължава. Показали частична ремисия са 7 (50%), със стабилизирано заболяване - 5 (35.7%) и с прогресиращо заболяване са 2 (14.3%) от пациентките.

След започване на втора линия химиотерапия беше събрана венозна кръв (трето посещение, означено със „CTC_пациент №_03“ от 16 от проследените пациентки на второ посещение, като по на този етап не бяха проследени, поради смъртта им при първа или преди втора линия химиотерапия общо 8 пациентки, а на останалите 8 не беше взета венозна кръв по други причини.

Резултатите от проведения качествен анализ на 16 (64%) пациентки на трето посещение показаха, че спрямо маркера GA733-2 23 от тях 15 (93.7%) са негативни и 1 (6.3%) е позитивна. Спрямо маркера MUC-1 23 (92%) са негативни и 2 (8%) са позитивни. За статуса на Her-2 резултатите показаха, че всички 25 пациентки са негативни. Циркулиращи туморни клетки се откриват при общо 2 от изследваните болни. Пациентка CTC_008_03 е позитивна по отношение експресията на два маркераа - GA733-2 и MUC-1, а пациентка CTC_032_03 е позитивна само за MUC-1.

При направеното сравнение между вторите проби на болните и третото им посещение се установи, че CTC_08 при изходното излседване е била носителка на GA733-2 и MUC-1, които изчезват при лечението и при второт посещение, но на третото посещение се появяват отново. CTC_032 запазва позитивния статус за маркера MUC-1 през трите посещения. Този резултат е показателен за неуспеха на приложената терапия и корелира с установената прогресия на заболяването след трети курс на. Ето защо проследяването на нивата на ЦТК в хода на терапия е от изключително важно значение за оценка на терапевтичния режим и е подкрепено от редица проучвания, свързани с МРГ (6-11).

Измерванията на обективния отговор към лечението в момента на взимане на пробите от трето посещение беше направено за 5 пациентки, за които разполагахме с необходимата информация. От тях няма такива, които да са показали пълна ремисия на туморите и съответно терапията продължава. Показали частична ремисия са 2 (40%), със стабилизирано заболяване са 2 (40%) и с прогресиращо заболяване са 1 (20%). При сравнението, което направихме за оценката на обективния отговор към терапията при второто и третото посещение на болните се установи, че няма промяна в отговора към терапията. CTC_008_03 продължава да прогресира, което се подкрепя и от повторната поява на ЦТК. Най-добрият обективен отговор е най-добрият отговор, постигнат от началото на проучването до момента на прогресия. Пациентки с общо влошаване на обективния статус, изискващо преустановяване на химиотерапията без да е документирана прогресия на заболяването се класифицират, като “симптоматично прогресирали”.

За пациентките бяха обобщени и пресметнати датата на диагнозата, дата на прогресия на заболяването, както и времето до прогресия, свободния от заболяване период и преживяемостта на пациентките според дата на тяхната смърт. Време до прогресия (ВП) е времето от започване на лечение с определен режим на химиотерапия до регистрирана прогресия. Обща преживяемост (ОП) е времето от диагностициране на метастазирало заболяване до датата на смъртта (Таблица 12).

Таблица 12. Данни за диагноза, прогресия и преживяемост на пациентките с метастазирал карцином на гърдата.

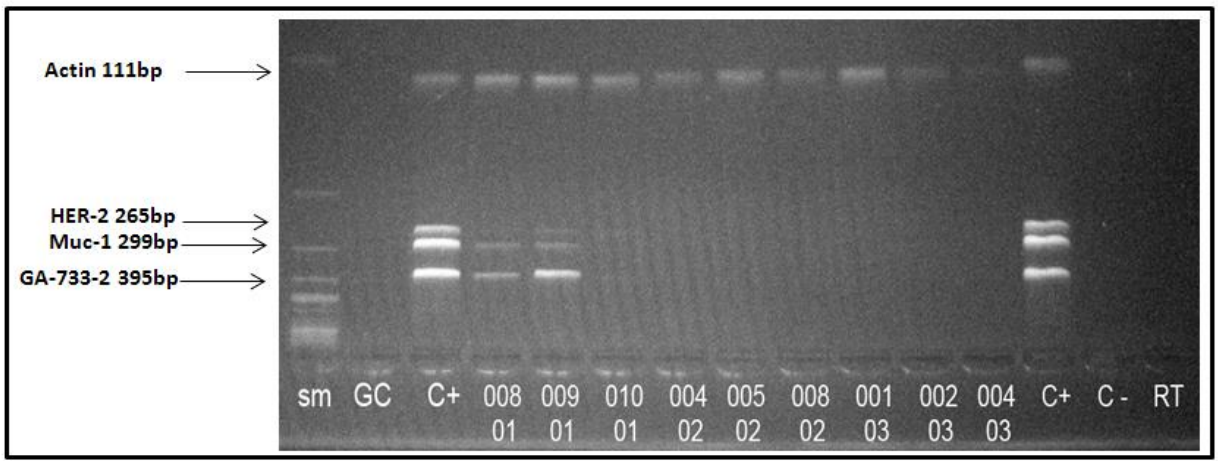
Проба ID	Дата на диагноза	Дата на прогресия	СЗП (мес)	Време до прогресия /месеци/	Дата на смърт	Преживяване /месеци/
CTC_001_01	11 авг 2011	11 авг 2011	0	0	ND	ND
CTC_002_01	23 авг 2010	24 окт 2011	14	14	20 юни 2014	46
CTC_003_01	15 юни 1986	9 янр 2012	307	307	12 март 2012	309
CTC_004_01	5 янр 2012	5 янр 2012	0	0	18 авг 2012	7
CTC_005_01	14 фев 2012	14 фев 2012	0	0	17 май 2013	15
CTC_006_01	29 юни	21март 2012	104	104	жива към 31	ND

	2003				дек 2016	
CTC_007_01	15 юни 2007	22март 2012	57	57	14 фев 2014	512
CTC_008_01	6 апр 2012	6 апр 2012	0	0	19 янр 2013	9
CTC_009_01	15 юли 1998	15 май 2012	166	166	6 март 2013	176
CTC_010_01	14 май 2009	24 юли 2012	38	38	30 сеп 2012	40
CTC_011_01	3 авг 2012	3 авг 2012	0	0	23 окт 2015	38
CTC_012_01	26 сеп 2012	26 сеп 2012	0	0	ND	ND
CTC_013_01	5 ноем 2012	5 ноем 2012	0	0	жива към 31 дек 2016	ND
CTC_014_01	27 сеп 2005	16 окт 2012	85	85	ND	ND
CTC_015_01	7 ноем 2012	7 ноем 2012	0	0	7 май 2015	30
CTC_016_01	30 май 2001	30 ноем 2012	134	134	жива към 31 дек 2016	ND
CTC_017_01	29 юни 2012	29 юни 2012	0	0	12 окт 2014	28
CTC_018_01	20 сеп 2010	4 дек 2012	27	27	16 фев 2014	41
CTC_019_01	19 окт 2009	15 дек 2012	39	39	29 ноем 2016	85
CTC_020_01	10 дек 2007	15 mar 2013	63	63	20 сеп 2014	45
CTC_021_01	2 май 2009	13 апр 2013	47	47	6 ноем 2016	90
CTC_022_01	10 май 2005	18 май 2013	96	96	жива към 31 дек 2016	ND
CTC_023_01	15 май 2013	15 май 2013	0	0	ND	ND
CTC_024_01	4 фев 2011	10 янр 2014	35	35	17 фев 2015	48
CTC_025_01	7 ноем 2011	15 юли 2014	32	32	24 апр 2014	29
CTC_026_01	29 ноем 2001	23 апр 2014	149	149	16 фев 2017	183
CTC_027_01	14 май 2014	14 май 2014	0	0	жива към 31 дек 2016	ND
CTC_028_01	12 юни 2012	13 mar 2014	21	21	16 юли 2015	37
CTC_029_01	29 ноем 2011	20 май 2014	30	30	жива към 31 дек 2016	ND
CTC_030_01	18 oct 2012	21 май 2014	19	19	21 юли 2015	33
CTC_031_01	01 фев 2009	3 юли 2014	65	65	ND	ND
CTC_032_01	24 юли 2014	24 юли 2014	0	0	жива към 31 дек 2016	ND
CTC_033_01	16 авг 2011	20 авг 2014	36	36	6 окт 2015	50
CTC_034_01	11 ноем 2002	7 окт 2014	143	143	жива към 31 дек 2016	ND

CTC_035_01	30 окт 1997	1 юли 2014	201	201	8 дек 2014	206
CTC_036_01	1 юни 2012	19 сеп 2014	27	27	13 ноем 2014	29
CTC_037_01	1 авг 2012	1 сеп 2014	23	23	18 юни 2015	34
CTC_038_01	21 янр 2008	29 окт 2014	81	81	жива към 31 дек 2016	ND
CTC_039_01	17 ноем 2014	3 дек 2014	72	72	29 март 2016	16
CTC_040_01	3 дек 2014	3 дек 2014	0	0	28 окт 2015	10
CTC_041_01	24 март 2011	6 ноем 2014	44	44	29 март 2016	60
CTC_042_01	1 дек 2013	4 дек 2014	12	12	8 май 2016	39
CTC_043_01	28 фев 2015	6 март 2015	1	1	ND	ND

При 16 пациентки анализът бе напълно завършен в трите дефинирани по-горе точки: диагностициране на метастазирало заболяване, преди започване на първа линия химиотерапия; след провеждане на III курс химиотерапия; и след провеждане на VI курс химиотерапия. Останалите пациентки са или починали в хода на изследването или са в процес на терапия и проследяване към днешна дата. Това се дължи на високите изисквания по отношение наличието на мерима лезия, което затрудни набирането на подходяща група за изследване, тъй като при МРГ най-чести са немеримите лезии, особено в кости.

Визуализация на получените данни беше извършена на 4% агарозна електрофореза, оцветена е етидиев бромид. Резултатът от един такъв анализ е представен на Фигура 5.



Фигура 5. Качествен експресионен анализ за наличие на туморасоциирани маркери при пациентки с МРГ. Детекцията на туморните маркери, амплифицирани чрез *PrimerMix BreastDetect,* е осъществена с помощта на 4 % агарозна електрофореза при оцветяване с етидиев бромид. Отляво надясно са показани експресионните профили на: пациенки CTC_008, CTC_009 и CTC_010 при изходно изследване (01); CTC_004, CTC_005 и CTC_008, след трети курс на

химиотерапия (02); и CTC_001, CTC_002 и CTC_004 след шести курс на химиотерапия (03).

4.4.3 Резултати от количествен анализ на експресията на молекулните маркери hMAM, CK-19, CD44 и CD24 в ЦТК от периферна кръв посредством Real Time RT-PCR

Резултатите от проведения експресионен анализ за маркерите са представени в таблица 53. На таблицата е показано наличието (с ДА), липсата на експресия (с -) или липсата на копиДНК проба с ЦММ (с N/D), при проследяване на пациентките. В таблицата не е включена информация за ендогенната контрола актин, тъй като тя е позитивна за всички анализирани порби. Резултатите от генно-експресионния анализ проведен и за здравите контроли не е представен, но при тях не се експресира нито един от маркерите с изключение на CD24. Поради този факт, в последсвие беше анализирано статистически разликата в експрсията на този маркер между болните и здравите участници (таблица 13).

✓ При нито един от пациентите или здравите контроли не беше налице експресия на маркера CD44.

✓ Експресия на другия маркер CD24 беше детектирана както при болните, така и при здравите контроли, но в различна степен - при 69.8 % (30/43) от пациентите на базисно ниво; 44 % (11/25) от пациентите, за които има налична проба на второ посещение след III курс терапия; 31.3 % (5/16) от пациентите, за които имат налична проба на трето посещение след IV курс терапия; при 75% (9/12) от здравите контроли също беше наблюдавана експресия на маркера.

✓ Експресия на маркер hMAM беше детектирана само при болните. При 16.3 % (7/43) от пациентите на базисно ниво; 4 % (1/25) от пациентите, за които има налична проба на второ посещение след III курс терапия; 18.8 % (3/16) от пациентите, за които имат налична проба на трето посещение след IV курс терапия.

✓ Експресия на маркер CK19 беше детектирана както само при болните. При 20.9 % (9/43) от пациентите на базисно ниво; 12 % (3/25) от пациентите, за които има налична проба на второ посещение след III курс терапия; 12.5 % (2/16) от пациентите, за които имат налична проба на трето посещение след IV курс терапия.

Таблица 13. Обобщени резултати от проведения количествен анализ на избраната група пациенти.

№ пациент	проследяване в хода на лечението											
	Базисно изследване _01				След III курс терапия _02				След IV курс терапия _03			
	CD24	CD44	hMAM	CK19	CD24	CD44	hMAM	CK19	CD24	CD44	hMAM	CK19
CTC_001	да	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTC_002	-	-	-	-	да	-	-	-	-	-	-	-
CTC_003	да	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_004	да	-	да	да	-	-	-	-	-	-	-	-
CTC_005	да	-	да	-	-	-	-	-	да	-	да	да
CTC_006	да	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_007	-	-	-	-	да	-	-	-	да	-	-	-

CTC_008	да	-	да	да	да	-	да	да	да	-	да	да
CTC_009	да	-	да	да	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_010	да	-	-	да	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_011	да	-	-	-	да	-	-	-	-	-	-	-
CTC_012	да	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTC_014	да	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_015	-	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_016	да	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTC_017	да	-	да	да	-	-	-	-	-	-	-	-
CTC_018	да	-	-	-	да	-	-	-	-	-	-	-
CTC_019	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTC_020	да	-	-	-	да	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_021	-	-	-	-	-	-	-	-	да	-	-	-
CTC_022	-	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_023	-	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_024	да	-	-	-	да	-	-	да	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_025	да	-	да	да	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_026	да	-	-	-	да	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_027	да	-	-	-	-	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_028	да	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTC_029	да	-	-	-	да	да	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_030	да	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_031	да	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTC_032	да	да	-	да	да	-	-	да	да	-	да	-
CTC_033	да	-	-	-	-	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_034	-	-	-	-	да	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_035	-	-	-	да	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_036	да	-	да	да	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_037	-	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_038	да	-	-	-	-	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_039	-	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_040	да	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_041	да	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_042	да	-	-	-	-	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D
CTC_043	-	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

При пациентките, които имат само проба от изходното първо изследване 2 от тях са позитивни само за CK19 (CTC_010 и CTC_035), а други 3 са позитивни и за двата маркера (CTC_009, CTC_025, CTC_036). От болните с липсващо трето посещение само 1 е позитивна за маркера CK19 (CTC_024) и той се появява само на второ посещение-изходната проба е отрицателна. Интересни са пациентите CTC_009, CTC_025 и CTC_024. CTC_009 и CTC_025 освен,че са позитивни и за двата маркера те

имат и положителен резулата за наличие на CTC от качествения анализ и по трите изследвани там маркера, а CTC_024 е негативна за CK19 и hMAM на изходното изследване и негативна за наличе на CTC от качествения анализ, но на второто посещение е позитивна за CK19, но и за CTC.

При болните, за които имаше налична проба от второ и трето посещение и които са били позитивни за експресията на CK19 и hMAM се наблюдава динамика в експресията на маркерите (Таблица 14). Всяка от петте пациентки показва за изходното излседване наличие на поне един от маркерите (CTC_005 и CTC_032) или на двата маркера (CTC_004, CTC_008, CTC_017) CK19 и hMAM. Всяка от тях е също така позитивна за минимум два от маркерите за качествен анализ на наличие на CTC.

Таблица 14. Сравнителен анализ на качествен и количествен анализ на част от пациентките с метастатичен рак на гърдата.

	_01		_02		_03		_01	_02	_03
Проба ID	hMAM	CK19	hMAM	CK19	hMAM	CK19	GA733-2/ Muc-1/ Her-2	GA733-2/ Muc-1/ Her-2	GA733-2/ Muc-1/ Her-2
CTC_ 004	да	да	-	-	-	-	да/да/-	-/-/-	-/-/-
CTC_ 005	да	-	-	-	ND	ND	да/да/-	-/-/-	-/-/-
CTC_ 008	да	да	да	да	да	да	да/да/-	-/-/-	да/да/-
CTC_ 017	да	да	-	-	-	-	да/да/-	-/-/-	-/-/-
CTC_ 032	-	да	-	да	да	-	да/да/да	-/да/-	-/да/-

За да се направи сравнение между нивата на експресия на CD24 между извадката от болни и здрави индивиди бяха направени калкулации включваши ΔCt (използвайки Ct стойностите получени от количествения анализ и Ct стойностите на бета актин като ендогенна контрола) , ΔΔCt (като за калибратор и сравнение се ползват ΔCt на здравите контроли) и колко пъти е променена експресията в сравнение с тях (fold change или Relative Quantification-RQ) по формулата -1/2 $^{-\Delta\Delta Ct}$. Резултатите са показани на таблица 15.

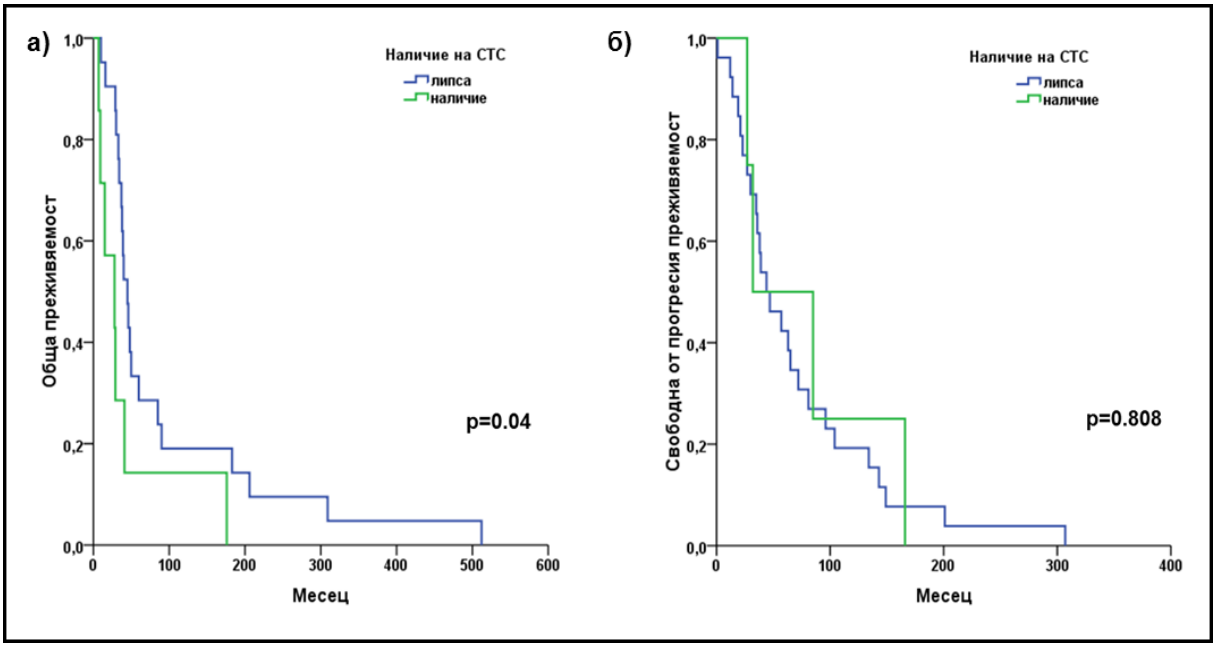
Таблица 15. Резултати след провеждане на количествен RealTime qPCR анализ при всяко от трите посещения (съотв. _01,_02,_03 на пациентите в хода на проекта) за всяка от числовите стойностите бяха пресметнати ΔCt, ΔΔCt и RQ.

№	ΔCt			ΔΔCt			RQ			P value		
пациент	_01	_02	_03	_01	_02	_03	_01	_02	_03	_01	_02	_03
CTC_001	5,7	-	-	2,1	-	-	0,24	-	-	0,002		
CTC_002	-	4	-	-	0,4	-	-	0,75	-		0,261	
CTC_003	6,8	N/D	N/D	3,2	N/D	N/D	0,11	N/D	N/D	0,002		
CTC_004	2,5	-	-	-1,1	-	-	2,12	-	-	0,032		
CTC_005	2,5	-	4,9	-1,1	-	1,3	2,12	-	0,4			0,196
CTC_006	3,6	N/D	N/D	0	N/D	N/D	1,01	N/D	N/D	0,972		
CTC_007	-	3,1	5,3	-	-0,5	1,7	-	1,43	0,32			0,04
CTC_008	2	4,5	1,3	-1,6	0,9	-2	2,99	0,55	4,93	0,018	0,072	0,0003
CTC_009	3,3	N/D	N/D	-0,3	N/D	N/D	1,22	N/D	N/D	0,281		
CTC_010	2,6	N/D	N/D	-0,9	N/D	N/D	1,93	N/D	N/D	0,014		
CTC_011	4	1,4	-	0,4	-2,2	-	0,77	4,58	-			
CTC_012	3,7	N/D	N/D	0,1	N/D	N/D	0,93	N/D	N/D	0,727		
CTC_013	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
CTC_014	8,9	N/D	N/D	5,3	N/D	N/D	0,03	N/D	N/D	0,001		
CTC_015	-	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-	N/D	N/D			
CTC_016	2,3	-	-	-1,3	-	-	2,44	-	-			
CTC_017	5,8	-	-	2,2	-	-	0,22	-	-			
CTC_018	8,8	5	-	5,2	1,4	-	0,03	0,39	-			
CTC_019	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
CTC_020	9,5	8,8	N/D	5,9	5,2	N/D	0,02	0,03	N/D	0,0003	0,0002	
CTC_021	-	-	5,7	-	-	2,1	-	-	0,23			0,19
CTC_022	6,2	ND	ND	2,6	ND	ND	0,17	ND	ND			
CTC_023	9	ND	ND	5,4	ND	ND	0,02	ND	ND	0,0002		
CTC_024	7	5,4	ND	3,4	1,8	ND	0,09	0,28	ND	0,001	0,028	
CTC_025	7,7	ND	ND	4,1	ND	ND	0,1	ND	ND	0,001		
CTC_026	9,3	ND	ND	5,7	ND	ND	0,02	ND	ND	0,0004		
CTC_027	6,2	-	ND	2,6	-	ND	0,2	-	ND	0,001		
CTC_028	7,6	-	-	4	-	-	0,1	-	-	0,012		
CTC_029	6,3	11	ND	2,7	6,9	ND	0,2	0,01	ND	0,004	0,0002	
CTC_030	3,6	ND	ND	0	ND	ND	1	ND	ND	0,883		
CTC_031	7,5	-	-	3,9	-	-	0,1	-	-			
CTC_032	5,3	4,7	ND	1,7	1,1	ND	0,3	0,5	ND	0,016	0,198	
CTC_033	3,6	5,7	ND	0	2,1	ND	1	0,2	ND			
CTC_034	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND			
CTC_035	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND			
CTC_036	5,7	ND	ND	2,1	ND	ND	0,2	ND	ND			
CTC_037	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND			
CTC_038	7	-	ND	3,4	-	ND	0,1	-	ND			
CTC_039	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND			
CTC_040	8,2	ND	ND	4,6	ND	ND	0,04	ND	ND	0,001		
CTC_041	6,2	ND	ND	2,6	ND	ND	0,2	ND	ND	0,003		
CTC_042	9,6	-	ND	6	-	ND	0,02	-	ND			
CTC_043	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND			

Направените изчисления показват, че при първо посещение 16.3% (7/43) от пациентите не показват отклонения в нивата на експресия спрямо здравите контроли; 9.3% (4/43) от пациентките имат повишена, в сравнение със здравите контроли,

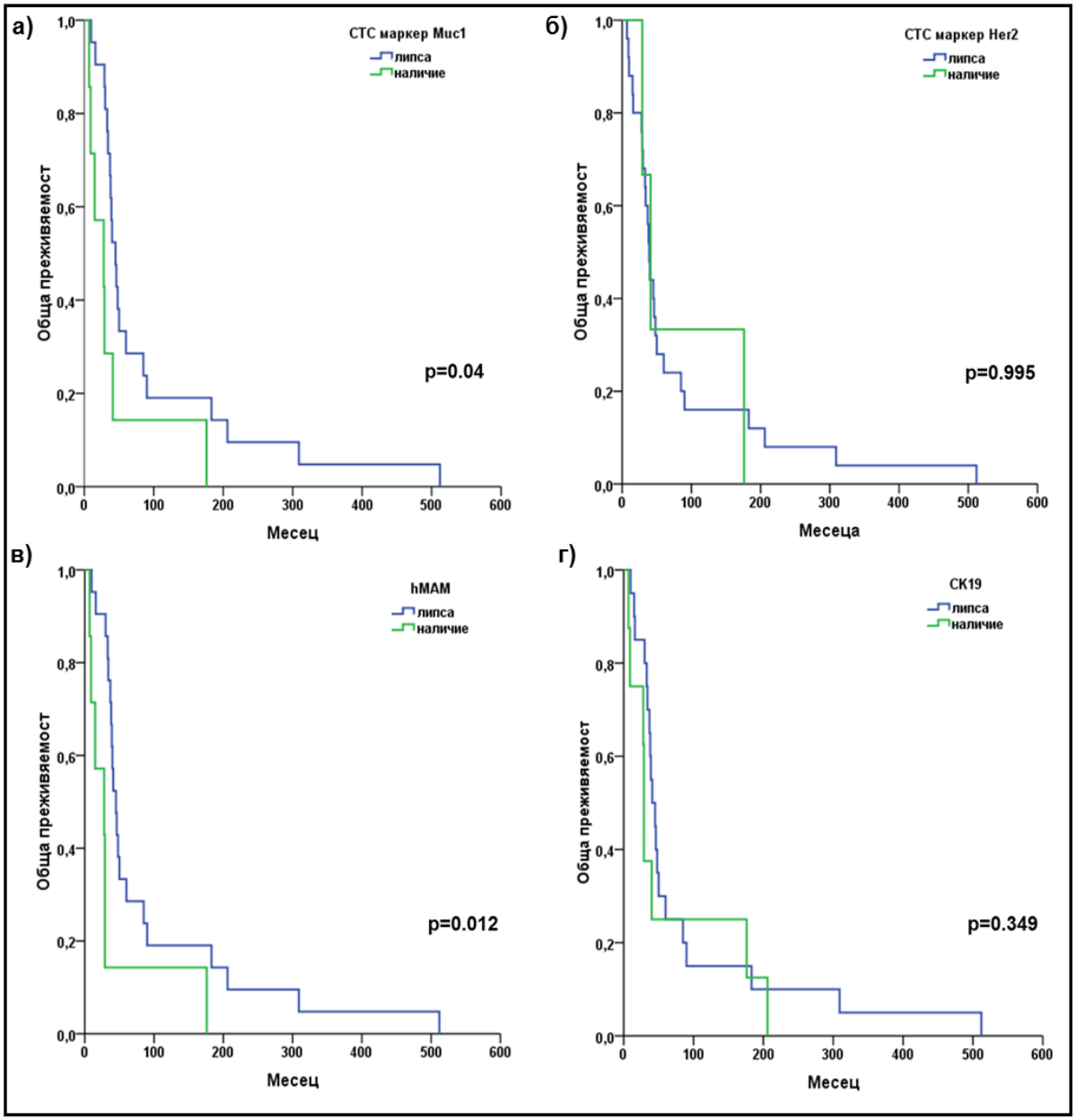
експресия или т.нар. fold upregulation на гена; при 48.8% (21/43) тя е fold downregulation или понижена в сравнение с контролите, а при останалите 25.6% (11/43) липсва екпсресия на гена CD24. Общо пациентите с фенотип $CD24^{-/low}$ (74.4%) надвишават тези с непроменена или повишена експресия (25.6%), което е в съответсвие с литературните данни.

От Kaplan-Meier графиките показани на фигура 6 се вижда, че наличието на циркулиращи туморни клетки при болни с метастазирал рака на гърдата има статистически значима разлика от тези без ЦТК при анализа за общата преживяемост и е свързано с по-лоша прогноза (p=0,04). Средната преживяемост на пациентите с ЦТК е 28 г., а на тези без ЦТК е 45 г. При направения статистически анализ за свободната от заболяване преживяемост не беше открита статистически значима разлика (p=0,808) между групите с и без ЦТК.



Фигура 6. Kaplan-Meier графики отразяващи преживяемост и свободната от заболяване преживяемост на пациентите с тумори на гърдата в зависимост от наличието или липсата на ЦТК.

Беше направен корелационен анализ за общата преживяемост (фиг 7) на пациенктите според експресията на маркерите Muc1 (а), Her2 (б), hMAM (в) и CK19 (г).Резултатите показват, че експресията на Muc1 (p=0,04) и hMAM (p=0,012) в ЦТК преди иницииране на адювантна терапия са статистически значими и са показателни за по-ниска преживяемост. За маркерите Her2 и CK19 не беше открита статистически значима (p= 0,995 и p= 0,349 съотв.) разлика между групите с и без маркера.



Фиг 7 Kaplan-Meier графики отразяващи преживяемост на пациентите с тумори на гърдата в зависимост от експресията на маркерите Muc1 (а), Her2 (б), hMAM (в) и CK19 (г).

Беше използван Cox регресионен анализ с цел изграждане на модел изчисляващ рисковия коефициент за всеки от изследваните фактори. Всички фактори, показали прогностична стойност бяха индивидуално анализирани с помощта на унивариационния Cox регресионен анализ използващ long-rank теста. С негова помощ фактори като възрастта на заболеваемост под 50 год. (p=0.027), липсата на CTC маркери (p=0.047), липсата на CTC MUC1 маркер (p=0.047) и липсата на CTC hMAM маркер (p=0.016) показаха по–добра прогностична стойност. За разлика от тях вида хистологична диагноза (p=0.604), туморния стадий (p=0.509), туморната локализация (p=0.515) и наличието на CTC маркери HER2 и CK19 (съответно p=0.995 и p=0.353) не показаха статистическа значима връзка с прогнозата – Табл. 16

Факторите показали значима връзка с преживяемостта бяха подложени на Мултивариационен Cox регресионен анализ. С негова помощ бяха отграничени тези

фактори, имащи независима прогностична стойност при изследваните пациенти. Мултивариационния регресионен анализ показа, че единствено възрастта има статистическа значимост като независими прогностични фактори, като той е предиктор за лоша преживяемост (HR=1.060, т.е. увеличаването с една година е съпроводено с влошаване на прогнозата на пациентите с 6.0 %).

Таблица 16. Унивариационен и мултивариационен Cox регресионен анализ за корелация между характеристиките на пациентите и общата преживяемост

	Унивариационен Cox регресионен анализ			Мултивариационен Cox регресионен анализ		
	HR	**95% CI**	**P**	**HR**	**95% CI**	**P**
Възраст (за година)	**1.041**	**1.005 - 1.079**	**0.027**	**1.060**	1.020 - 1.103	**0.003**
Хистологична диагноза DC&IDLC vs. ILC&adeno	1.279	0.505 – 3.236	0.604	*	*	*
Туморен стадий 1&2 vs. 3&4	0.743	0.307 - 1.796	0.509	*	*	*
Туморна локализация (лява vs. дясна)	0.771	0.353 - 1.686	0.515	*	*	*
наличие на CTC маркер # липса vs. наличие	**0.406**	**0.167 – 0.989**	**0.047**	*	*	*
наличие на CTC GA733-2 # липса vs. наличие	**0.406**	**0.167 – 0.989**	**0.047**	*	*	*
наличие на CTC MUC1 # липса vs. наличие	**0.406**	**0.167 – 0.989**	**0.047**	0.887	0.066 - 11.936	0.928
наличие на CTC HER2 липса vs. наличие	0.996	0.296 – 3.352	0.995	*	*	*
наличие на CTC CK19 липса vs. наличие	0.671	0.289 – 1.558	0.353	*	*	*
наличие на CTC hMAM липса vs. наличие	**0.329**	**0.133 – 0.815**	**0.016**	0.198	0.014 - 2.866	0.235
наличие на CD24 експресия понижена vs. норм/повишена	1.355	0.440 – 4.169	0.596	*	*	*

* Показателят не е включен в мултивариационния анализ; # - двата показателя показват силна корелация по-между. HR – hazard ratio; CI – интервал на достоверност; p – p-стойност

Направения корелационен тест на Spearman показа, че наличието на ЦТК, GA733-2 и Muc1 показват статистически значима силна корелация (Таблица 17).

Таблица 17. Spearman тест за корелации

Spearman's rho		CTC_Muc1
CTC_Ga-733-2	Корелационен коефициент	0,868**
	p -стойност (2-tailed)	<0,001
	N	43

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

V. Обсъждане на получените резултати

5.1 Валидиране на Ion Torrent PGM секвениране на гените BRCA1 и BRCA2

Герминативни мутации в BRCA1и BRCA2 гените имат отношение към голяма част от наследствените форми на рак на гърдата и яйчниците. Носителите на патогенни мутации в тези гени имат изчислен доживотен риск от 45% до 87% за развитие на рак на гърдата и от 11% до 40% риск за рак на яйчниците (2,3).

За да се направи оценка на ефективността на Ion Torrent PGM платформата при *BRCA1/2* мутационен скрининг, използвахме 8 пациента (тренировъчна група) с известен *BRCA* генетичен профили 8 пациента (валидационна група) с неизвестен *BRCA* генетичен профил. Избраните пациенти бяха с установени инсерции, делеции и еднонуклеотидни замени, намиращи се както в кодиращите региони, така и в хомополимерни региони на гените. Двата гена са избрани като тестови, т.к. са с големи размери – 15 kB общо на кодиращите последователности, освен това са силно полиморфни и имат множество хомополимерни региони.

Вариантите, които бяха заложени като тестови бяха от следните типове: 7 frameshift, 13 IVS, 12 missense, 10 CDS-synon и 2 UTR. Избраните контролни варианти за тестване на методиката са представени на (Таблица 36, „Резултати“).

5.1.1. Анализ на покритието и откриване на варианти

Всички сравнения на точността на определяне на вариантите бяха направени при покрития от 3x и 30x, а валидирането на избраните филтри беше извършено при покритие от 30x. Наблюдава се значително повишение в качеството на резултатите от секвенирането при преминаване към версия 2 на апаратурата и китовете за подготовка на библиотеки. Основни причини за по-високото покритие в тези експерименти бяха ниската поликлоналност, ниския процент на прочитите извън таргетните региони, както и равномерното покритие на панела.

Чувствителността (100%) и специфичността (98%) в нашето изследване са сравними с резултатите от други подобни проучвания- Costa и съавтори откриват вариантите с чувствителност 98.6% и специфичност 96.9% (4–6). Авторите показват, че за определяне на всички генетични варианти (единични промени и indel) със сигурност, достатъчна за диагностично приложение, е нужно покритие от 130x (4–6). Беше определена също така и емпиричната стойност на минималното покритие (в случая - 70x), нужно за определянето на всички варианти в групата от изследвани пациенти. По-високите стойности и равномерност на покритието повишават чувствителността и намаляват броя на фалшиво-позитивните indel варианти, както се вижда от характеристиките на последните няколко експеримента (Фиг. 27 и Таблици 39,40, „Резултати“). Въпреки че в тренировъчната група бяха открити всички очаквани варианти с минимален брой фалшиво-позитивни, частта от генния панел, която достигна изискваното покритие от 30x, беше около 53%. Това подчертава ползата от равномерното покритие за ефективното определяне на реалните генетични варианти.

Осигуряването на равномерно покритие е много по-ефективен начин за постигане на пълно покритие на таргетните региони, отколкото постигането на много високо средно покритие. Доказателство за това е фактът, че не се наблюдават разлики в ширината на покритието (процент на покритие на дължината на таргетния регион) на 309-те ампликона на AmpliSeq панела, въпреки че дълбочината варира до 7 пъти

(Таблица 38. „Резултати“). Единствената видима разлика е сигурността на определяне на вариантите (Таблица 39, „Резултати“).

Дори резултатите с по-неравномерно покритие от първите два експеримента (тренировъчната група и валидационна група 1) показват, че, дори при дълбочина на покритието под 30x, високо-производителните подходи могат да подпомогнат класическото секвениране по Sanger в региони с висок шум или трудна амплификация.

5.1.2. Валидиране на вариантите

Фалшиво-позитивните сигнали в проведените експерименти могат да се разделят на две основни групи: грешки в хомополимерни последователности с дължина над 4 бази и често появяващи се грешки в региони с по-висока сложност (по-малък брой повторения или липса на хомополимер).

Първата група се получава в резултат на известните вече проблеми на платформата да определя правилно дължината на хомополимерните последователности (7). Тези грешки се наблюдават при по-ниски покрития и при липса на контрол на баланса на прочитите в двете посоки. Вариантите от втората група се появяват в голям брой проби, винаги на една и съща позиция, но в малък процент от прочитите. Тази група е слабо свързана с хомополимерните региони, но повсеместната и поява предполага технически фактори като потенциална причина за наблюдаваните грешки. Вариантите от тази група може да са специфични за платформата грешки, които стават по-видими при ниски покрития. Като пример, една от делециите (GRCh37.p13:g.32972389delC) беше открита в половината проби от първите два експеримента (тренировъчния и валидация 1), които имаха сравнително малка дълбочина на покритие. Тази делеция обаче на беше потвърдена в нито една от пробите. Същата делеция беше открита в малък брой прочити и в следващите експерименти с по-високо покритие, но не беше докладвана от софтуера поради много по-ниската алелна честота. Това потвърждава заключенията от други изследвания, които демонстрират нуждата от филтриране на indel варианти откривани в голям брой проби (на практика - повече от две). Докато Tarabeux et al.(6) прилагат статистически подход към премахването на вариантите, които не се наблюдават с достатъчна алелна честота в данните (над две стандартни отклонения от средната честота на други фалшиво-позитивни indel варианти), в нашето изследване използваме няколко различни стратегии за alignment (картиране на прочитите) и определяне на вариантите с цел по-висока чувствителност и специфичност. Въпреки това, в случаите когато източникът на генетичния материал може да предоставя няколко различни популации от последователности (например туморна и нормална тъкан), статистическият подход може да е по-добре пригоден да разграничи истинските от фалшивите indel варианти.

Ампликони, съдържащи варианти в хомозиготно състояние, не показваха по-ниско покритие от съседните ампликони, както и от други региони на гена за съответната проба, водейки до извода че наблюдаваната хомозиготност не е резултат от загуба на фрагмент от едната хромозома (LOH, loss of heterozygosity), а случайно явление. Хомозиготните варианти бяха потвърдени със секвениране по Sanger и за двете проби.

5.1.3. Сравнение на протоколите за подготовка на библиотеките

С цел да се сравнят два метода за подготовка на библиотеките бяха взети предвид няколко критични стъпки. Първо, за амплифициране на кодиращата последователност на двата гена изпозвахме нашите in-house Всички фрагменти трябваше да бъдат нормализирани по размер и концентрация преди започването на

създаването на библиотеките. Второ, за да подготвим високо качествени библиотеки от ампликоните включени в тренировъчната група и първата валидационна група, за които използваме метода Ion Xpress Plus gDNA Fragment Library Preparation, трябваше ензимно да фрагментираме ампликоните и да оптимизираме времето на инкубация с рестриктазите. Късите ампликони не изискват селекция по размер, но трябва да бъдат конструирани така, че да са по-къси от средният размер, който се изисква по протокол за генериране на библиотеките - 260 бази, като с добавката на адапторите ще се трансформира в 330 базови двойки библиотека. Накрая, няколкото стъпки на пречистване с магнитни частици и промиване на фрагментите увеличават риска от загуба на фрагменти с всяка стъпка на пречистване. Като заключение може да се каже, че Ion Xpress Plus gDNA Fragment Library Preparation протокола за подготовка на библиотеките е дълъг и изисква оптимизация на няколко критични стъпки.

За останалите валидационни групи използвахме протокола AmpliSeqTM v2.0 за подготовка на библиотеките. Той не беше наличен към момента на започване на валидирането на метода и подготовкта на първите две групи. Имайки предвид гореспоменатите недостатъци на първия протокол, използвайки готов панел за амплификация на райните от интерес - Ion AmpliSeqTM BRCA1 and BRCA2 Community Panel, в комбинация с новия протокол за работа, елиминира проблеми като нуждата от ръчно амплифициране на всеки ампликон индивидуално, нормализация, фрагментиране, загуба на фрагменти при пречистването или при селекцията по размер. И двете техники за генериране на библиотеките предоставят висока чувствителност и специфичност, които са необходими за диагностичен анализ на двата гена.

5.1.4 Приложение на платформата в диагностичното секвениране

Ion Torrent Personal Genome Machine системата показва затруднения в анализирането на варианти, които са в хомополимерни участъци, делеции и инсерции (7,8). Въпреки това според много автори тя може да се използва за диагностични цели, стига да се достигне достатъчна дълбочина на прочитите на районите, които ни интересуват и да се спазват някои правила на качествения анализ (4–6). Важно е да се отбележи, че райони които не показват достатъчно добра дълбочина на прочитите и в двете посоки могат да съдържат истински позитивни варианти, и че такива райони могат да се наблюдават, въпреки цялостно добро покритие. Те се наблюдават предимно в края на ампликони, чиито краища не се застъпват с ампликони в близост до тях.

Ion AmpliSeq™ BRCA1 and BRCA2 панелът в комбинация с Ion AmpliSeq™ химията при използване на платформата Ion Torrent PGM е надежден NGS базиран диагностичен тест за секвенитане на *BRCA1* и *BRCA2* гените при диагностика и профилактика при високорискови пациенти с рак на гърдата и яйчниците. Настоящото изследване спомогна за утвърждаване на бърза и точна диагностична методика за детекция на мутации в *BRCA1/2* гените, пследвана от директно секвениране за потвържение на получените резултати. Също така беше определено оптималното покритие от 70x, общо за всички секвенции, което е необходимо за детекция на всички налични варианти. Прилагането на NGS методиката значително ще намали цената и времето за анализ на мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените при диагностиката, лечението и профилактиката на семейства с фамилен рак на гърдата и яйчниците.

5.2 Следващо поколение секвениране на 94 тумор-асоциирани гена при BRCA негативни пациентки с рак на гърдата

Герминативни мутации в BRCA1 и BRCA2 гените обясняват само около 15 до 20% от фамилните случаи на рак на гърдата и яйчника (9,10). Голяма част от генетичната предразположеност, определяща риска от развитие на рак на гърдата и яйчника все още остава неизяснена.

Поради тази причина усилията на изследователските екипи са насочени в търсене мутации в гените със средна пенетрантност като функционални партньори на BRCA1 и BRCA2 в ДНК репарацията. В тази група влизат гени като BRIP1, PALB2, CHEK2, ATM, NBS1, RAD50, TOPBP1, RAD51C, RAP80, които имат предразполагащ ефект за развитието на рак на гърдата и яйчниците (11). Втора насока е определянето на влиянието на ниско пенетрантни алели, асоциирани със заболяването, посредством големи асоциативни проучвания от типа случаи-контроли в рамките на целия геном (GWASs) (9). Част от тези гени се свързват с редица синдроми, при които се развиват ракови заболявания. Така, например синдромите на Li-Fraumeni, Peutz-Jeghers и Cowden се обясняват с мутации в *TP53, STK11* и *PTEN* гените (9,10,12). Резултатите от проведеното новогенерационно секвениране на панел от 94 тумор асоциирани гени при 31 BRCA-негативни пациентки с рак на гърдата и яйчниците показаха наличие на 1 frameshift патогенна мутация в гена ATM, 6 нови за базите данни и литературата вероятно патогенни варианти в гените MUTYH, ATM, CHEK2, PTCH1, RAD51C и MET гените, както и 7 известни патогенни мутации в гените WRN, ERCC4, PALB2, PRF1,RET, SDHB и AIP гените (Таблица 44, „Резултати“).

5.2.1 ATM

ATM е серин/треонин киназа, която се привлича към и се активира от двойноверижните скъсвания на ДНК веригата ATM е ген, асоцииращ се с рака на гърдата, от групата на нископенетрантните гени и гените с ниска честота. Доказателствата за повишения риск от заболяването идват от изследвания с носители на хетерозиготни ATM мутации (13). Около 0.5%-1% от представителите на общата популция са носители на герминативни хетерозиготни мутации. Епидемиологични проучвания показват, че жените носители на такива мутации имат повишен риск за развитие на заболяването, който е изчислен на 3.9 (95% confidence interval [CI] 2.0–6.0) (14). Киназните функции на ATM се изпълняват чрез 350 аминокиселинен участък между 2712 и 2962 аминокиселина. Но функциите на киназата могат да бъдат засегнати ако се повлияе и някой от другите домени, например в нашия случай FAT домена, в който се открива патогенната мутация, тъй като той е място за саморегулация чрез автофосфорилиране и вероятно има роля при взаимодействието със субстратите на ATM (15).Откритата в настоящото проучване frameshift мутация p.Glu2139IlefsTer6 не се открива в литературните източници. Тя е от типа frameshift мутации, която води до терминиране на транслацията на белтъка и скъсен продукт на гена до 2145 аминокиселина. Тази мутация води до отпадането на най-важния домен на белтъка – киназния и крайния домен, отговорен за пълната активация на ATM. Това води до невъзможност за изпълнение на така важните функции в ДНК поправката.

Tavera-Tapia и съавтори (16) извършват цялостно екзомно секвениране на 1477 HBOC семейства, които нямат мутации в BRCA гените и показват новооткрити варианти в други гени. Откриват нова мутация в ATM гена за Испанската популация с честота 1.78% от HBOC пациентите и 1.94% за пациентите само с рак на гърдата (16). В

допълнение към изследваните пациенти те анализират и 350 индексни пациенти с друго заболяване което не е свързано с рака на гърдата и не откриват мутацията при нито един от тях. Откритата от нас нова мутация в ATM гена е с честота 3.2% (1 от 31 пациента). Носител на този вариант е пациентка с билатерален рак на гърдата, която има сестра с меланом (Mn) в окото и друга сестра с рак на гърдата, баба по майчина линия с рак на гърдата и дядо по майчина линия с рак на стомаха . И при родствениците – двете сестри и нейната здрава дъщеря се открива същата мутация. ATM е среднопенетрантен ген при рака на гърдата, който определя риск от 2.8 (95% CI 2.2–3.7) (17) за развитие на заболяването, но изследването му в миналите години е било ограничено от големия му размер- 150 килобази. Използвайки технологията за следващо поколение секвениране определят честотат на носителсвто на мутации в този ген, която е малко по-висока от откритата такава в други популации като Япония (0.69%) или САЩ (1.41%) при BRCA негативни пациентки с рак на гърдата и/или яйчника. Високата честота на мутации в ATM гена в Испанската популация а и при нас определя нуждата от по-обширно изследване герминативните мутации в гена и влиянието му при пациентите с рак на гърдата(16).

5.2.2 MUTYH

MUTYH (mutY DNA glycosylase) е човешки ген кодиращ ДНК гликозилаза, участваща в поправка на ДНК при оксидативен стрес. Мутации в този ген могат да причинят автозомно рецесивна форма на Фамилна Аденоматозна Полипоза (ФАП). Повечето от докладваните мутации в гена водят до синтез на нефункционален или слабо функциониращ гликозилазен ензим. В литературата се откриват данни за асоциация на мутациите в MUTYH гена с рака на гърдата (18–20). Установената при нашата кохорта пациенти мутация p.Ala266Gly (A266G) не се открива в базите данни. Откритата мутация попада в домена за свързване с MSH6 белтъка, който е основен в поправката на двуверижни скъсвания при репликация. Мутацията се определя като вероятно патогенен миссенс вариант чрез програмите за предикция на ефекта на еднонуклеотидни замени в белтъците- SIFT и PolyPhen-2. Носител на този вариант е пациентка с рак на гърдата, която има братовчедка по бащина линия с рак на гърдата, майка с ендометриален рак и баба по майчина линия с рак на гърдата. При тази пациентка се открива допълнително още една известна патогенна мутация p.Ile127Leu (I127L) в гена SDHB, описана по-долу.

5.2.3 CHEK2

CHEK2_генът дава инструкции за синтезата на протеин наречен checkpoint киназа 2. Този белтък действа като туморсупресор като регулира клетъчното делене чрез регулация на скоростта на растежа на клетките по време на клетъчния цикъл. Белтъкът се активира ако ДНК бъде увредена от токсични агенти и химикали, радиация, ултравиолетово лъчение или по време на репликацията(21). В отговор на повредата CHEK2 си взаимодейства с други белтъци, включително най-основния туморсупресорен протеин TP53, които да „задържат“ клетъчното делене докато не се установи дали клетката ще продължи успешно в клетъчния цикъл или ще бъде насочена за апоптоза. Този механизъм възпрепятства деленето на мутирали клекти и съответно развитието на тумори (22).

Откритата мутация p.Glu437Lys (E437K) не се открива в базите данни, но е определена като вероятно патогенна чрез програмите за предикция SIFT и PolyPhen-2. Разполага се в екзон екзон 11 от киназния домен на гена, подобно на S428F и е с

предполагаем патогенен ефект. Носител на този вариант е пациентка с ранен рак на гърдата (28г), която има баща с левкемия, баба по бащина линия с рак на гърдата или яйчника, дядо по майчина линия с рака на стомаха. В допълнение към този вариант е открит и друг вариант при същата пациентка p.Tyr791Phe (Y791F) в RET гена, описана по-долу.

5.2.4 PTCH1

PTCH1 функционира като рецептор за лиганда Sonic Hedgehog. Patched-1 (PTCH1) и Sonic Hedgehog си взаимодействат в сигнален път, който е много важен за ранното развитие, клетъчния растеж, клетъчната специализация (23). При липсата на лиганда, рецепторът спира клетъчната пролиферация. Поради контрола си върху тези събития се смята, че той е тумор-супресор (23). В литературата се откриват малко данни за асоциацията на гена с рака на гърдата, но се предполага че засягането на споменатия сигнален път, с участието на двата белтъка, повлиява правилното развитие на клетките на млечната жлеза (24–26). Откритата мутация p.Pro369Thr (P369T) се определя като вероятно патогенна чрез програмите за предикция SIFT и PolyPhen-2 и не се открива в базите данни. Локализира се в първия N-краен екстрацелуларен домен на белтъка, които отговарят за свързването на лиганда . Би могло да се предположи, че тя влияе на ефекта на свързване на рецептора с лиганда. Носител на този вариант е пациентка с рак на гърдата, която има сестра на бабата по бащина линия с рак на гърдата, дядо по майчина линия с рак на белия дроб, сестра на дядото по майчина линия с рак на гърдата, сестра и брат на дядото по майчина линия с друг вид тумори, две лели по майчина линия с рак на гърдата и братовчедка по майчина линия също с рак на гърдата.

5.2.5 RAD51C

RAD51C е член на RAD51 семейството белтъци. Те участват в хомоложната рекомбинация и ДНК поправката (27). Този белтък взаимодейства с други от семейството и с BRCA1 и 2 белтъците, основни за т.нар. Holliday junction resolution. Мутации в гена се асоциират със синдрома анемия на Фанкони, част от който е и рака на гърдата (28,29). Установената мутация p.Leu27Pro (L27P) не се открива в базите данни, но е вероятно патогенна спрямо програмите за предикция SIFT и PolyPhen-2. Носител на този вариант е пациентка с рак на гърдата, която има рак на гърдата и в последствие е развила и рак на яйчника, с майка с ранен рак на гърдата (32г.) и ранен рак на яйчника (35г.), както и племенница по майчина линия с рак на гърдата.

5.2.6. MET

MET гена кодира член на рецепторните тирозин кинази и е прото-онкоген. Мутациите в гена често се асоциират с карциноми на бъбреците, хепатоцелуларен карцином и различни тумори на главата и шията . Амплификация и свръх експресия на гена също се асоциира с много други видове рак (30–32). Тези мутации се откриват в т.нар. SEMA домен и в юкстамембранния домен. Откриват се също и активиращи мутации в тирозин киназния домен (30).

Много малко са проучванията, които показват честотата на MET мутации при рака на гърдата (33). Мутациите в тирозин-киназния домен не са често срещани, но в промоторния HGF район те са установени при около 15% от изследваните пациенти с рак на гърдата в Европа и при над 50% от афроамериканците с това заболяване (42).

Откритата в настоящото изследване мутация p.Arg280Met (R280M) не се открива в базите данни, но е вероятно патогенна спрямо програмите за предикция SIFT и PolyPhen-2. Локализира се в SEMA домена. Носител на този вариант е пациентка с билатерален ранен рак на гърдата (35г. и 38г, която.), която има чичо по майчина линия с лимфома, дъщеря на чичото с рак на гърдата и чичо по бащина линия с рак на белия дроб.

5.2.7 WRN

WRN е тумор-супресорен ген, който дава инструкции за синтезата на Werner белтъка който участва в поправката на ДНК. Белтъка поддържа структурата и интегритета на генома с важна гункция при репликацията. Установено е,че има важна роля и за поддържането на теломерите (34). Синдрома на Werner, с който се асоциират промени в белтъка е автозомно рецесивно заболяване, характеризиращо се с преждеврменно стареене и висока честота на туморогенеза в частност на неепителни тумори като саркома на меките тъкани и бенигнена менингиома (35). Откритата p.Arg637Trp (R637W) мутация е известна в базите данни и се локализира в хеликазния домен. Носител на този вариант е пациентка с рак на гърдата, която има майка с ранен рак на гърдата и сестра с рак на гърдата.

5.2.8 ERCC4

ERCC4 белтъка (още известен като XPF или FANCQ), кодиран от съответния ген, образува комплекс с ERCC1 и участва в 5' –срязването на ДНК веригата, по време на поправка на ДНК .Дефекти в гена ERCC4 са причина за ксеродерма пигментоза комплементационна група F или ксеродерма пигментоза VI. Биалелните мутации в гена са идентифицирани като причина за Анемия на Фанкони тип Q и за синдрома Cockayne (36,37). Фанкони анемията е рядко рецесивно заболяване, характерно за което са вродени малформации, прогресивна костна деструкция и предразположение към различни видове рак. За сега не е ясно как и дали мутации в гена са отговорни за предразположеността към рак на гърдата и яйчника (38). Откритата p.Pro379Ser (P379S) мутация е известна в базите данни и се локализира в хеликазно подобен район на гена. Носител на този вариант е пациентка с ранен рак на гърдата (32г.), която има майка и баба по майчина линия с рак на гърдата в отсъствие на други варианти с доказан патогенен ефект.

5.2.9 PALB2

PALB2 гена кодира белтък, който е тумор супресор, свързващ се с BRCA2 и осигряващ неговата стабилност, активност и локализация (39). Играе критична роля при поправката на ДНК при хомоложната рекомбинация като привлича BRCA2 и RAD51 към местата на скъсванията. Той изпълнява функцията на молекулно скеле за образуването на комплекса BRCA1-PALB2-BRCA2 чрез WD повтора си. Свързва ДНК чрез D-loop (40). Известно е, че мутациите в гена водят до повишен риск за развитие на рака на гърдата. Откритата p.Leu939Trp (L939W) мутация е известна в базите данни и се локализира в WD 2 повтора, отговорен за свързване с важния комплекс с BRCA2 и RAD51 (Фиг. 14). Носител на този вариант е пациентка с билатерален рак на гърдата (43г. и 53г.), която има майка с рак на гърдата и рак на белия дроб, братовчедка по бащина линия с рак на гърдата и леля по майчина линия с предполагаем рак на гърдата.

5.2.10 PRF1

PRF1 генът кодира белтъка перфорин. Перфоринът участва в процеса на цитолиза (разрушаване на клетките) и в регулацията на имунната система (41,42). Перфоринът помага за образуване на канали на мембраните, за да проникнат вътре цитолитичните белтъци и да се унищожи клетката. По същия механизъм се унищожават и Т-клетките, които не са нужни на имунната система. Мутациите, водещи до загуба на функция на белтъка силно намаляват способността за осъществяване на цитотоксичната активност на клетките на имунната система (43). Откритата p.Ala91Val (A91V) мутация е известна в базите данни и се локализира в MACPF домена на PRF1, отговорен за образуването на порите в мембраната на таргетните клетки. Мутацията в екзон 2 първо е описана като неутрален полиморфизъм, но скорошни изследвания показват потенциален патогенен ефект, особено при сложни хетерозиготни индивиди, за лимфохистиоцитоза тип 2 и лимфоцитна левкемия (44). Носител на този вариант е пациентка с ранен рак на гърдата (38г.), която има майка и баба по майчина линия с рак на гърдата.

5.2.11 RET

RET кодира трансмембранен белтък, прото-онкоген с рецепторна тирозин киназна активност (45). Мутации, водещи до загуба на функция на гена водят до болест на Хиршпрунг, а тези от типа „придобиване“ на функция водят до различни предразположения към ракова заболявания - на щитовидната жлеза (46), множествена ендокринна неоплазия тип 2A (MEN2) и 2B (46), феохромоцитома и паратиреоидна хиперплазия (47). Мутации и нарушена експресия на гена се асоциират и с рака на гърдата (48–50). Откритата p.Tyr791Phe (Y791F) мутация е известна в базите данни и се локализира в тирозин киназния домен, отговорен за каталитичната активност на белтъка RET. Носител на този вариант е пациентка с ранен рак на гърдата (28г), която има баща с левкемия, баба по бащина линия с рак на гърдата или яйчника, дядо по майчина линия с рака на стомаха.

5.2.12 SDHB

Succinate dehydrogenase subunit B (SDHB) генът кодира една от четирите субединици на сукцинат-убихинон оксидоредуктаза и е установено,че действа като тумор супресор (51). Ролята му при туморите е известна, но в контекста на рака на гърдата проучванията са ограничени (52). Понижената експресия на гена се асоциира с растеж и дедиференциация на колоректалните туморни клетки (53). Откритата p.Ile127Leu (I127L) мутация е известна в базите данни и се локализира в 2Fe-2S фередоксин подобен желязо-серен свързващ домен, отговорен за правилното функциониране на белтъка. Носител на този вариант е пациентка с рак на гърдата, която има братовчедка по бащина линия с рак на гърдата, майка с ендометриален рак и баба по майчина линия с рак на гърдата.

5.2.13 AIP

AIP генът кодира белтък, наречен арил хидрокарбон рецептор-свързващ белтък (aryl hydrocarbon receptor-interacting protein). Смята се, че действа като тумор-супресор, вероятно като възпрепятства по неизвстен механизъм неконтролируемото делене на клетките (54,55). Фамилна изолатна аденома на щитовидната жлеза (FIPA) е автозомно доминантно заболяване с различни генетични компоненти и непълна пенетрантност. Герминативни мутации в гена AIP са докладвани при 15-40% от FIPA пациентите (54,56). Ролята на мутациите в AIP при фамилния рак на гърдата и яйчника все още не е изяснена. Откритата p.Arg304Gln (R304A) мутация е известна в базите данни и се локализира в FKBP-PPI- изомеразен домен. Носител на този вариант е пациентка с рак на гърдата с ранно начало (29г), която има леля и чичо по майчин линия с рак на гърдата и дядо по бащина линия с рак на мозък.

Couch и съавтори (57) анализират честотат на мутации в панел от 17 тумор-асоциирани гени, включително BRCA1 и BRCA2, при 1824 пациента с тройно-негативен подтип рак на гърдата, които не са селектирани по фамилна история за рака на гърдата или яйчника. Патогенни мутации са открити при 14.6% от всички пациенти. От тях 11.2% са били с мутации в BRCA1 (8.5%) или BRCA2 (2.7%). Патогенни муации са открити и в 15 други гени при 3.7% от пациентите като най-голяма част са гени обвързани с хомоложната рекомбинация- PALB2 (1.2%) и BARD1, RAD51D, RAD51C, BRIP (0.3%-0.5%). Пациентите с тройно-негативен рак на гърдата носещи мутации са диагностицирани с ранно начало на заболяването и са с висок грейд на туморите от тези без мутации (57).

Buys и съавтори (58) публикуват едно от най-големите проучвания в сферата на панелното секвениране на пациенти с HBOC. Те анализират 35 409 жени с рак на гърдата, като жени с няколко случая на рак на гърдата и мъжете с това заболяване не са анализирани, със NGS панел от 25 тумор-асоциирани гена. Честотата и разпределението на патогенните варианти са определени при цялата кохорта, сред жените с тройно-негативен рака на гърдата и по възраст на диагноза. Патогенни варианти са наблюдавани при 9.3% от изследваните жени. 51.5% от патогенните варианти са открити в други гени различни от BRCA- CHEK2 (11.7%), ATM (9.7%), и PALB2 (9.3%). Преобладават мутации в BRCA1, PALB2, BARD1, BRIP1 и RAD51C при пациентите с тройно-негативен рака на гърдата. Нивото на мутациите при жените под 40 години е по-високо и по-ниско при тези над 59 години и относително постоянно при жени между 40 и 59 години. Тези резулатти показват,че панелното секвениране повишава процента на носителките на патогенни мутации в сравнение само с анализирането на двата най-високо пенетрантни гени- BRCA1 и BRCA2 (95).

Tedaldi и съавтори (59) използват панел от 94 гена при 255 жени, 57 от които имат патогенни мутации в BRCA1/2 гените, а 17 носят муутации в други гени като PALB2, ATM, BRIP1, RAD51D, MSH6, PPM1D, RECQL4, ERCC3, TSC2, SLX4 и други Fanconi anemia гени. Пациентите с мутации в тези други гени не показват различия с пациентите с мутации в BRCA1 или BRCA2 в контекста на възраст на диагнозата и клинични показатели, което предполага, че те могат да отговарят за повишен риск от развитие на заболяването също както BRCA1/2 гените. Сред тези пациенти се срещат и голям процент случаи на билатерален карцином на гърдата и по-малко случаи на рак на яйчника отколкото BRCA носителите.

Jun Li и съавтори (60) изследват 600 BRCA негативни пациентки с фамилен рак на гърдата за 17 гени асоциирани със заболяването. Откритите патогенни мутации са изследвани и при родственици на пациентите за да се определи ко-сегрегацията на вариантите в семейството. Те откриват 31 патогенни мутации в 7 гена- TP53, PALB2,

ATM, CHEK2, CDH1, PTEN и STK11 при 45 пациента и 22 потенциално патогенни мутации при 31 пациентки в 8 гена BARD1, BRIP1, MRE11, NBN, RAD50, RAD51C, RAD51D и CDK4. Вариантите са анализирани при 558 членове на семействата на тези пробанди. Определяйки константния относителен риск за развитие на заболяването сред групите пациенти разделени по възраст само CDH1, CHEK2, PALB2 и TP53 показват доказателства за значително повишен риск от рак на гърдата, а ATM-среден риск.

За първи път в България беше използван метод за новогенерационно секвениране на панел от 94 тумор-асоциирани гени при BRCA негативни пациенти с рак на гърдата. Установено беше,че 11 от 31 пациентки (35.5%) са носители на патогенна или вероятно патогенна мутация. Бяха открити мутации в 13 гена- PTCH1, RAD51C, MET, MUTYH, ATM, CHEK2, WRN, ERCC4, PALB2, PRF1, RET, SDHB и AIP като мутациите са 14 различни вида две от които в ATM гена, а останалите носят по една. Осем от откритите мутации са сигурно патогенни, а останалите шест са вероятно патогенни според програмите за предикция на ефекта Sift и Polyphen.

5.3 Анализ на соматични мутации в тумори на пациентки с рак на гърдата с MiSeq платформа за следващо поколение секвениране

Известно е, че ракът на гърдата е силно хетерогенно заболяване и се класифицира в няколко подтипа (61,62). През последните години, благодарение на микрочипови генно експресионни анализи, карциномите на гърдата бяха класифицирани на пет основни подтипа: луминална А група, луминална В група, HER2 (+) група, Claudin-low и базална група (5-8). Друга класификация е на база експресията на естрогенов рецептор (ER), прогестеронов рецептор (PR) и ERBB2 (HER2) и според иРНК експресионно профилиране (9,10). При проведеното новогенерационно секвениране на панел от 48 тумор-асоциирани гена, бяха открити 43 вида патогенни и вероятно патогенни мутации в 17 от гените (Приложение 1). Най-много различни мутации бяха установени в гените PIK3CA и TP53.

5.3.1 PIK3CA

PIK3CA кодира фосфоинозитол-3 киназа, чиято роля е свързана с фосфорилиране на фосфатидилинозитол, фосфатидилинозитол-4 фосфат и фосфатидилинозитол-4-5 бисфосфат до фосфатидилинозитол-3,4,5 трифосфат, който от своя страна участва в привличането на PH-домен съдържащи белтъци към мембраната като AKT1 и PDPK1, активиращи сигнали за клетъчен растеж, оцеляване, пролиферация, подвижност и морфология на клетките (63).При изследването на събраната група тумори на пациенти с рак на гърдара беше установено, че най-много мутации се акумулират именно в този ген. Наблюдавани бяха 9 различни миссенс мутации, от които една нова с честота 29.7%. Две от мутациите се намират в p85 свързващия домен на белтъка, три - в „гореща точка“ на мутации в киназния домен и четири - в „гореща точка“ на мутации в хеликазния домен. Сигналният път, включващ PI3K/AKT/mTOR е вътреклетъчен сигнален път важен за регулирането на клетъчния цикъл (64) Ето защо той директно е свързан с клетъчното делене, пролиферацията и туморогенезата. Фосфорилирането и активирането на PIK3CA активира AKT, локализирайки го в плазмената мембрана. При много видове рак този път е свръх активиран и подтиска апоптозата, увеличавайки клетъчната пролиферация (65). PI3CA сигнализацията е най-често

засегнатия път при рака на гърдата (66). Мутации в гена се наблюдават при около 30% от туморите на гърдата, заедно със загуба на функциите на гена PTEN. След първото откриване на мутации в *PIK3CA* при солидни тумори през 2004 г., множество изследвания са установили прогностичните и терапевтични приложения на тези мутации (67–71). Въпреки че, ролята на някои от тях все още не е напълно изяснена, са установени и потвърдени следните факти: 1) *PIK3CA* се наблюдават най-вече при ER-позитивни/HER2-негативни тумори; 2) *PIK3CA* мутациите могат да се наблюдават заедно с други съпътстващи промени като HER2 амплификация или загуба на белтъчните функции на PTEN; 3) Мутациите в гена са добър прогностичен маркер; 4) *PIK3CA* мутация е маркер и за лош отговор към терапия с трастузумаб, но влиянието й върху свободната от заболяване преживяемост и общата преживяемост е неясно (66).

5.3.2 ERBB2

ERBB2 е познат като HER2/neu и кодира член на рецепторите за епидермалните растежни фактори (72). Той е тирозин киназа, но няма собствен лиганд като растежен фактор, а като хетеродимер се свързва силно с другите рецептори от семейството, като стабилизира и засилва киназната им активност. В средата на 80те години ERBB2 е установен като инициращ туморогенезата онкоген (73,74). Амплификацията и/или свръхексперсията на гена е докладвана при редица туморни заболявания, най-често при тези на гърдата и яйчниците (75,76). Установено е, че те играят важна роля в развитието и прогресията на определени агресивни видове рак на гърдата (112). В последните години ERBB2 е важен биомаркер и цел на терапиите за около 30% от пациентите с рак на гърдата (77). След свързване с лиганда, белтъците от семейството на ERBB опосредстват нормалната клетъчна пролиферация и оцеляване чрез два сигнални пътя - Ras-Raf-MAPK и PI3K/Akt/mTOR. ERBB2 действа само под формата на хетеродимер с някой от останалите белтъци от семейството и е предпочитан партньор за димеризация (78). Най-активният хетеродимер е ERBB2/ERBB3, който действа като онкогенна единица. Активирането на ERBB2 се случва в следствие на три типа соматични мутации - малки инсерции и миссенс мутации в киназния домен, миссенс мутации в екстрацелуларния домен или големи делеции в екстарцелуларния домен (78). Резултатите от настоящото изследване показват наличие на три миссенс мутации в района на вътреклетъчния киназен домен, две от които са нови за базите данни. Те са локализирани в екзон 21 (2 от мутациите) и в екзон 22 (1 мутация). Повечето, установни до момента мутации са локализирани в три екзона - 19, 20 и 21 на тирозин киназния домен. Откритите миссенс мутации при нашите пациенти са локализирани в екзон 21 (2 от мутациите) и в екзон 22 (1 мутация).Според наличната информация в литературата вероятността да има мутация в ERBB2 гена при пациентите с рак на гърдата е 1.67% (79). Честотата на мутациите в него при изследваната от нас група от български пациентки с рак на гърдата е доста по-висока- 14 от 91 пациентки (15.4%).

5.3.3 ERBB4

Свързването на лиганда към ERBB4 води до активиране на сигналните пътища PI3K/Akt/mTOR и Ras-Raf-MAPK. Освен чрез сигнални каскади ERBB4 може да активира пътища директно в ядрото, след като бъде процесиран от белтъците TACE и γ secretase, които освобождават разтворим вътреклетъчен рецепторен домен на белтъка, регулиращ транскрипцията. Много са изследванията на гена за ролята му при рака на

гърдата и е установено, че той притежава както онкогенни, така и туморсупресорни функции (80). Свръхекспресията на гена, заедно с всеки друг член от семейството също показва свойството да трансформира нормални клетки в туморни (80). Той регулира и транскрипцията на гени регулирани от естрогена и опосредства естроген-индуциран растеж на клетките от рак на гърдата (80). При нашите пациенти се открива една нова вероятно патогенна мутация в рецепторния тирозин киназен домен при 4.4 % от изследваните пациентки.

5.3.4 APC

APC кодира туморсупресорен белтък, който действа като антагонист на Wnt сигналния път(81). Участва в клетъчната адхезия и миграция, активиране на транскрипцията и апоптозата. Дефекти в гена водят до пре-малигненото заболяване фамилна аденоматозна полипоза, което впоследствие преминава в злокачествено заболяване(81). Играе роля и в няколко други фундаментални процеса - клетъчната адхезия, миграция, организацията на актин и микротубулната мрежа, образуване на делителното вретено и хромозомната сегрегация (81). Нарушението на тези пътища води до туморогенеза (81). APC е мутирал или е хиперметилиран при 70% от спорадичните случаи на рака на гърдата, като показва зависимост и от подтипа карциноми (82,83). Мутации в гена променят туморната хистопатология от солидни към сквамозни аденокарциноми - най-агресивните метапластични тумори на рака на гърдата (84). Изследвания показват, че FAK/Src/JNK сигналният път регулира усилената пролиферация при мутирал APC ген (84). Въпреки това, ролята на APC в осигуряване на хемотерапевтичната устойчивост на рака на гърдата остава неизяснена. Загубата на функции на APC значително повишава устойчивостта на туморните клетки към цисплатин-медиираната апоптоза (84). Повторната поява на рак на гърдата (90% от смъртните случаи от рака на гърдата) често е съпътствано от устойчивост към химиотерапия (85). Критично е да се установят маркерите водещи до тази устойчивост. APC мутации в миши модели водят до повишена експресия на MDR1, който е повишен след третиране с доксорубицин или паклитаксел (85). APC мутации също намаляват цисплатин- и доксорубицин опосредстваната апоптоза. Лечението на тези клетки с комбинацията цисплатин и Src или JNK инхибитори възстановява апоптозата (85). Това е от съществено значение за елиминиране на химиотерапевтичната устойчивост при APC мутирали туморни клетки от гърдата. Взети заедно всички открития водят до заключението, че загубата на функции на APC значително повлиява хемотерапевтичната устойчивост на клетките от рака на гърдата (85).

Откритите мутациите в APC гена при пациентките в настоящото изследване са две миссенс мутации, които се намират в най-важния район със струпване на множество мутации, отговарящ за свързването и разграждането на beta catenin и с GSK3-beta фосфорилирането. Едната от мутациите е нова, а другата е известна за COSMIC базата данни, но е открита в други видове тумори. APC мутациите се откриват в 13 % от изследваните пациентки.

5.3.5 ATM

ATM е активна серин/треонин киназа. ATM има основна роля в ДНК поправката на двуверижни скъсвания, процес който включва разпознаване на мястото на скъсване, привличане на други белтъци, сигнализация за преминаване в различните фази на клетъчния цикъл, регулация на транскрипцията или активиране на апоптозата (84). В нормалните клетки ATM е под формата на инертни димери или мултимери. В отговор

на двуверижните скъсвания той дисоциира в силно активни мономери, автофосфорилира се в мястото на Серин1981 и се привлича към мястото на скъсване, където инициира каскада с фосфорилиране на ключови за поправката белтъци като TP53, BRCA1 и CHEK2 (84). Swift и колеги първи предполагат, че родственици на пациенти с атаксия телангиектазия са с повишен риск от развитие на рака на гърдата (98). Техният анализ показва, че родствениците имат 2.3 пъти повишен риск за мъжете и 3.1 за жените. Около 1% от представителите на общата популация може би са носители на мутации в ATM, водещи до атаксия телангиектазия (86). Няколко епидемиологични проучвания на заболеваемостта от рак при родствениците потвърждават повишения риск от рак на гърдата - риск от 3.9 пъти и 2.23 (86). Спрямо профила на установените мутации, при две от групите пациенти, които се откриват, се наблюдава една и съща frameshift мутация в ATM гена . Може да се предположи, че frameshift мутацията в ATM на първата и втората група е иницииращата патогенезата мутация, а останалите са т.нар съпътстващи мутации. Мутацията p.Thr1743LysfsTer13 в ATM е нова за базите даннии и се среща при 11 от изследваните пациенти (12%). Мутацията води до отпадането на най-важните домени на гена- FATC, FAT и киназния домен, чрез който осъществява функциите си .

Има изследвания за Българската популация за статуса на мутации в ключови гени при пациенти с рак на гърдата (112) Божанов и съавтори изследват мутационния спектър в свежи туморни тъкани от спорадичен рак на гърдата за мутации в гените p53, BRCA1, ATM и PIK3CA и експресията на HER2 (76). Те откриват,че TP53 мутациите се срещат с честота 20-40%, в зависимост от размера на тумора и стадия на заболяването и често се асоциират с по-агресивна туморогенеза и по-лоша прогноза. Различните мутации се асоциират с устойчивост на радиотерапия и химиотерапевтични агенти (76). При сравнението на честотата на срещане на мутации в тези гени с получените в дисертационния труд резултати се установява,че нашите пациенти имат честота на срещане на мутациите при 91 пациентки за гените p53, ATM и PIK3CA съответно 9.9%, 13.2% и 29.7%. Сравнявайки клиничните параметри авторите показват, че носителите на мутации в TP53 имат по-големи и по-слабо диференцирани тумори като същото се наблюдава и при нашите пациенти, срещат се предимно в туморите с G3 стадий, в сравнение с ATM и PIK3CA ($P < 0.0001$), което показва, че мутациите в TP53 са тясно свързани с дедиференциацията (76). Мутиралият TP53 намалява общата преживяемост при пациентите с рак на гърдата, но не се показва като независим фактор. TP53 мутиралите пациенти са над 50 годишни и имат по-лоша прогноза от тези над 50 години без мутации (76) .

COSMIC е базата данни, в която се намира информация за откритите соматични мутации в различни видове туморни проби (87). Сравнителния анализ с нашите резултати показва, че 70% от всички мутационни събития се откриват в гените PIK3CA, ERBB2, APC, ATM и TP53 . Гените с най-чести соматични мутации в изследваната група тумори на български пациенти са PIK3CA, ERBB2, APC, ATM и TP53. Установеният профил на най-чести соматични мутации в PIK3CA, ERBB2, APC, ATM и TP53 се различава от този в базите данни, което потвърждава необходимостта от повече проучвания в тази насока (Таблица 18).

Таблица 18. Сравнение между данните за соматични мутации в гени свързани с рак на гърдата в COSMIC базата данни и получените резултати.

ген	COSMIC честота	честота в изследваните пациенти
PIK3CA	27%	26%
TP53	24%	9%
CDH1	10%	0%
PTEN	4%	3%
RB1	4%	1%
AKT1	3%	1%

На базата на анализирания спектър от соматични мутации могат да се отграничат няколко подгрупи със сходни молекулни профили в рамките на основните хистологични подтипове тумори, което може да се използва за прецизиране на терапията- Първата група е в част от Луминален А тип и се характеризира с наличието на една и съща frameshift мутация в ATM, и струпване на миссенс муации в гените PIK3CA, ERBB2 и APC, но липсват мутации в TP53; Втората група е в групата на Луминален Б тип и се характеризира със същата frameshift мутация в ATM гена, но има струпване на мутации вгените PIK3CA, ERBB2, но липсва както TP53 така и APC гена;Третата група се открива в останалите пациенти от Луминален А и се характеризира с липсата на frameshift мутацията в ATM гена и наличие на мутации в PIK3CA, ERBB2, ERBB4, APC и имат мутации в TP53 и BRAF и четвъртата група се открива в останалите пациенти на Луминален Б тип и се характеризира с предимно миссенс мутации в PIK3CA, единични мутации в APC, TP53, PTEN и RET, но липсват мутации в ATM и BRAF .

5.4 Анализ на резултатите получени при изследването на циркулиращи туморни клетки при пациенти с метастазирал рак на гърдата.

Някои автори показват, че ЦТК могат да се използват като прогностичен маркер не само при метастазирало заболяване, но и при ранен рак на гърдата (88). Нивата на детекция на ЦТК варират между 9-40% за ранен рак на гърдата (89,90) и между 17-61% при метастатичен рак на гърдата (91–93). Няколко проучвания показват, че наличието на 5 или над 5 клетки на 7.5 мл кръв по време на терапия оказва влияние върху свободната от заболяване преживяемост, общата преживяемост и при ранното откриване на пациентки, които не отговарят добре на терапията (94–96). ЦТК с характеристики на епителни клетки са рядко явление в периферната кръв на раково болните пациенти като общ брой (<10 клетки/мл кръв) и в сравнение с кръвните клетки (една ЦТК на 10^6-10^7 левкоцити) (97). Идентифицирането на ЦТК се основава на директни цитометрични подходи с антитела (имуноцитохимични, имунофлуоресцентни и флуолцитометрични или индиректни методи като иРНК базиран RT PCR (102,103).

Голямото предимство на анализите с ЦТК от периферна кръв е липсата на инвазивност, висока цена и времеемкост в сравнемние с биопсиите. ЦТК се изследват с т.нар. „течна биопсия“, която представлява еднократно взимане на кръв и по

нататъшно характеризиране на клетките с всички – „омикс“ технологии. Използваният кит Adna Test Breast Cancer изолира и обогатява ЦТК на базата на имуномагнитна селекция на клетките с повърхностно клетъчни и туморспецифични антигени. Определянето на положителни резултати се прави на база експресията на поне един от трите маркера GA733-2, MUC1 или HER2. В допълнение към маркерите за качествен анализ, беше изследвана и експресията на няколко други маркера - CK19, hMAM, CD24 и CD44 с RT-PCR

При анализа на резултатите, направени за изходното изследване на пациентките с качествения анализ посредством AdnaTest се установи, че 10 от тях (23.3 %) са позитивни за ЦТК, като всички те са позитивни за маркера GA733-2 (23%), 8 пациентки (18.6%) са позитивни за маркера MUC-1, а 4 от тях са позитивни за маркера Her-2 (9.3%).

При анализа на резултатите с количествения анализ посредством RT-PCR се установи, че при нито еднаот пациентките или здравите контроли не беше налице експресия на маркера CD44.

Експресия на другия маркер CD24 беше детектирана както при болните, така и при здравите контроли, но в различна степен - при 69.8 % (30/43) от пациентите на базисно ниво; 44 % (11/25) от пациентите, за които има налична проба на второ посещение след III курс терапия; 31.3 % (5/16) от пациентите, за които имат налична проба на трето посещение след IV курс терапия; при 75% (9/12) от здравите контроли също беше наблюдавана експресия на маркера.

Експресия на маркер hMAM беше открита само при болните. При 16.3 % (7/43) от пациентите на базисно ниво; 4 % (1/25) от пациентите, за които има налична проба на второ посещение след III курс терапия; 18.8 % (3/16) от пациентите, за които имат налична проба на трето посещение след IV курс терапия.

Експресия на маркер CK19 беше детектирана както само при болните. При 20.9 % (9/43) от пациентите на базисно ниво; 12 % (3/25) от пациентите, за които има налична проба на второ посещение след III курс терапия; 12.5 % (2/16) от пациентите, за които имат налична проба на трето посещение след IV курс терапия .

5.4.1 GA733-2 2 е синоним на епителния клетъчно адхезионната молекула EpCAM. EpCAM е трансмембранен гликопротеин опосредстващ Ca^{2+} - независима клетъчна адхезия в епитела (99). Участва в клетъчната сигнализация (100), миграция (101), пролиферация и диференциация (102). Има онкогенен потенциал с възможността си да регулира c-myc, e-fabp и циклини A и E (103). EpCAM се експресира изключително в епителните клетки и епителните карциномни клетки и се използва за диагностичен маркер при много тумори. Играе роля в туморогенезата и метастазирането на карциномите и може да се използва като потенциален прогностичен маркер и потенциална мишена за имунотерапевтични стартегии (104).

5.4.2 MUC1 е муцин- гликопротеин (105), който лежи в апикалната повърхност на епителните клетки на белия дроб, стомаха, червата, очите и други органи (106). Муцините предпазват тялото от инфекции и патогени (107). Свръхекспресия на муцин 1 често се асоциира с рак на дебелото черво, гърдата, яйчниците, белия дроб и панкреаса (108). Учени идентифицират и характеризират антигена именно по време на изследване на рак на гърдата и яйчника (106). Предполага се, че с процес на естествен подбор в нарастващите туморно-клетъчни популации се създават клетки, които експресират нови комбинации и форми на муцини и спомагат за оцеляването на тези клетки по време на навлизането в тъканите и метастазирането (106). Муциновия слой от клетки поема и задържа биологично активни молекули като при туморните клетки

се задържат растежни фактори и цитокини, които спомагат растежа на туморните клетки. Тези фактори също регулират възможностите на имунните, възпалителните и стромните клекти да взаимодействат с тумора (106). Муцините участват в регулацията на диференциацията и пролиферацията на туморните клетки чрез лиганд-рецепторни връзки и морфогенетична сигнална трансдукция. Туморите, които произвеждат високи нива на разтворими муцини ги насочват към заобикалящата тумора среда или метастатични лезии, създават бариера за левкоцитите и се предпазват от навлизането им в тумора и възможността им да се борят с него (106).

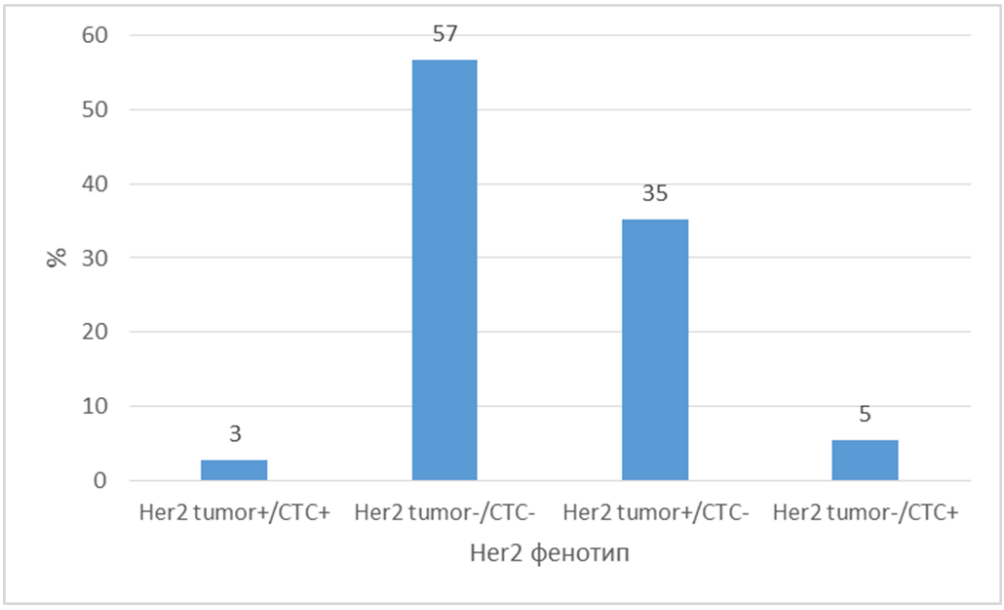
5.4.3 HER2 кодира член на рецепторите за епидермалните растежни фактори. Амплификацията и/или свръхексперсията на гена е докладвана при редица туморни заболявания, най-често при тези на гърдата и яйчниците (79,109,110). Амплификацията или свръхекспресията на този онкоген играе важна роля в развитието и прогресията на определени агресивни видове рак на гърдата. В последните години той е важен биомаркер и цел на терапиите за около 30% от пациентите с рак на гърдата (77).

HER2 е свърекспресиран и амплифициран в около 15% от пациентите с рака на гърдата и е маркер за лоша прогноза. Терапията на този вид тумори включва изпозването на антитела срещу него-трастузумаб. Циркулиращи туморни клетки при пациентки с напреднал ER позитивен/HER2 негативен рак на гърдата придобиват HER2 позитивен статус след няколко курса терапия (111,112). За разлика от HER2 амплифицираният първичен тумор на рака на гърдата, който е силно чувствителен към анти-HER2 терапия, клиничната картина при придобитата HER2 хетерогенност на циркулиращите клетки по време на метастазирането е неясна. Изследователи откриват, че при изследвани от тях 19 жени с ER+/HER2− първични тумори, 84% имат ЦТК експресиращи HER2 (113). Култивирани ЦТК поддържат субпопулации от HER2 + и HER2 – клетки. Установено е, че HER2+ клетките са по-пролиферативни, и не зависят изцяло от свързаната с него сигнализация, а от активиране на други сигнални пътища, докато HER2- ЦТК показват активиране на Notch сигналния път и показват устойчивост на цитотоксична химиотерапия поради активирането и на сигнали за ДНК поправката, но са чувствителни към инхибиране на Notch сигналната трасндукция(113). HER2+ и HER2- ЦТК се преобразуват едни в други като клетките с един фенотип дават като дъщерни клетки с другия (127). И двата вида клетки имат сходен тумор инициращ потенциал, по-пролиферативни са тези с HER2+ фенотип, докато оксидативния стрес или цитотоксичната химиотерапия усилва появата на клектите с HER2- фенотип. Тези изследвания показват, че динамичните промени в статуса на ЦТК имат отношение към прогресията на рака на гърдата и придобиването на резистентност към терапевтични агенти(113).

В настоящото проучване, при направения анализ на статуса на Her2 в първичния тумор и този на ЦТК на пациентките, за които има информация за първичния тумор (37 от 43, 86 %) се установи следното (Фиг 8):

- Две пациентки (5%)- CTC_009 и CTC_032 имат Her-2 негативен хистологичен резултат на първичния тумор, но имат Her-2 позитивен статус на ЦТК;
- Тринадесет пациентки (35%) имат Her-2 позитивен хистологичен резултат на първичния тумор, но имат Her-2 негативен статус на ЦТК;
- Двадесет и една пациентки (57%) имат Her-2 негативен хистологичен резултат на първичния тумор и имат Her-2 негативен статус на ЦТК;
- Една пациентка (3%) има Her-2 позитивен хистологичен резултат на първичния тумор и Her-2 позитивен статус на ЦТК;

- Шест пациентки нямат данни за Her-2 на първичния тумор и са изключени от анализа.



Фигура 8. Процентно разпределение на пациентите с различни профили на първичния тумор и циркулиращите туморни клетки спрямо маркера HER2.

В подкрепа на данните за туморната хетерогенност е динамиката на експресия на маркера при 15 пациентки (40%), които показват различия в двата статуса. След започване на първа линия химиотерапия, след 3 курса, се наблюдава промяна на статуса на ЦТК при някои от пациентките:

- При 2 от пациентките (CTC_018 и CTC_32), показали положителен резултат на рецептора HER2 при ЦТК преди започване на терапията експресията на маркера изчезва след провеждане на три курса химиотерапия. Едната от тях няма данни за първичния тумор, но все пак се вижда динамиката в статуса дори само на ЦТК.
- Две от пациентките (CTC_009 и CTC_025) с разминаване на статуса и които са позитивни за HER2 на изходното изследване не бяха проследени поради смъртта на едната и липсата на данни за другата
- При една от пациентките, позитивна за експресия на рецептора в първичния тумор и показала липса на експресия при ЦТК преди терапия, след три курса на лечение изолираните от нея ЦТК са вече позитивни за HER2

След започване на втора линия химиотерапия, след 6 курса, не се наблюдава промяна на статуса на ЦТК при пациентките CTC_018 и CTC_32, които остават негативни по HER2 статуса на ЦТК, а CTC_020 не може да бъде проследена поради липса на данни.

5.4.4 CD24 е гликопротеин, експресиращ се на клетъчната повърхност на повечето В лимфоцити и диференциращи се невробласти. Според няколко научни групи при рака на гърдата, фенотип който се характеризира с CD44+CD24-/lowALDH1+ се асоциира с наличие на субпопулация от туморни клетки сред изолираните ЦТК, които имат потенциал на стволови клетки.

Нашите резултати показват различен фенотип, тъй като при нито един от пациентите или здравите контроли не беше налице експресия на маркера CD44. Експресия на другия маркер CD24 беше детектирана както при болните, така и при здрвите контроли, но в различна степен - при първо посещение 16.3% (7/43) от

пациентите не показват отклонения в нивата на експресия спрямо здравите контроли; 9.3% (4/43) от пациентките имат повишена, в сравнение със здравите контроли, експресия или т.нар. „fold upregulation“ на гена; при 48.8% (21/43) тя е „fold downregulated“ или понижена в сравнение с контролите, а при останалите 25.6% (11/43) липсва екпсресия на гена CD24 (Таблица 55, „Резулатати“). Общо пациентите с фенотип CD24−/low (74.4%) надвишават тези с непроменена или повишена експресия (25.6%), което е в съответсвие с литературните данни.

5.4.5 Цитокератин 19 (CK-19) е член на семейството на клетъчните кератини - интермедиерни клетъчни филаменти, отговарящи за поддържането на структурния интегритет на епителните клетки. Поради високата си чувствителност той е най-използваният маркер при PCR в реално време за детекция на туморни клетки, отделили се от първичната туморна маса и разпространени в лимфните съдове, кръвоносната система и костния мозък при пациенти с метастазирал рак на гърдата (114–117).

5.4.6 Човешкият мамаглобин (hMAM) е хомоложен на утероглобиновото семейство белтъци и се експресира в ниски нива при нормалния епител на млечната жлеза. Експресията му е много висока в тъканта при рак на гърдата. hMAM нормално не се експресира в кръв от здрави индивиди и в костен мозък (115). Ignatiadis и съавтори откриват, че наличието на CK-19 и мамаглобин A позитивни ЦТК преди иницииране на адювантна терапия е свързано с намалена преживяемост (118). Xenidis и съавтори откриват, че наличието на CK-19(+) ЦТК се асоциира с ранен клиничен релапс и смърт вследствие на заболяването (89), Strati и съавтори показват, че при 26 случая на пациенти с доказани метастази, CK-19 е детектиран при 53.8% от пациентите, а hMAM при 30.8% и, че позитивните по експресия на CK-19, HER2 и hMAM пациенти имат по-кратък период на време до прогресия на заболяването (119).

Нашите резултати показват наличие на експресия на CK19 в 20.9 % (9/43) от пациентите на базисно ниво; 12 % (3/25) от пациентите, за които има налична проба на второ посещение след III курс терапия; 12.5 % (2/16) от пациентите, за които имат налична проба на трето посещение след IV курс терапия и за hMAM в 16.3 % (7/43) от пациентите на базисно ниво; 4 % (1/25) от пациентите, за които има налична проба на второ посещение след III курс терапия; 18.8 % (3/16) от пациентите, за които имат налична проба на трето посещение след IV курс терапия.

Ако се вземат предвид данните от качествения анализ и данните от експресионния анализ на останалите 3 маркера, може да се предположи, че при пациентите, при които не се наблюдава експресия на CD24, всъщност няма и ЦТК. При проследяването на пациентите на следващите две посещения се наблюдава динамика в нивата на маркера. Интересна е пациентка CTC_008, коментирана по- горе, при която качественият анализ показва повторна поява на два маркера в течение на терапията, както и наличие на други два маркера (CK19, hMAM) в хода на терапия, а така също и динамика на CD24. При нея CD24 е с повишена концентрация преди започване на терапията и след 6 курса значително се повишава. Пациентки номер 18 и 20 показват положителен резултат за наличие на ЦТК от качествения анализ, а по отношение на CD24 запазват силно понижени нива на експресия на гена.

Най-голямото проучване за клиничната стойност на изследванията с ЦТК използва CellSearch® технологията за определяне нивата на ЦТК при онкоболни. Включват се данни от 1944 пациента с метастатичен рак на гърдата от 20 европейски проучвания (120). В това проучване 46.9% от пациентите имат ≥5 CTC/7.5 ml кръв на изходното изследване преди започване на терапия. Тези пациенти имали ниска свободна от прогресия преживяемост (hazard ratio [HR] 1.92, $p < 0.0001$] и ниска обща преживяемост (HR 2.78, $p < 0.0001$) в сравнение с пациентите с нисък брой ЦТК (<5 CTCs/7.5 ml) (129). Тяхната клинична стойност като независим прогностичен фактор е

показана и при рака на дебелото черво (121), простата (122) и белия дроб (123,124). Много изследвания за рака на гърдата показват,че жените с високи нива на ЦТК преди терапия, но ниски нива след един курс терапия имат по-добра прогноза от тези с непроменени нива при лечението (СПП 9.6 months, 95% CI 8.2–11.1 срещу 4.8 (3.7–6.5), p < 0.0001 и обща преживяемост 27 месеца 95% CI 21.7–31.5 срещу 13.1, 95% CI 9.4–16.4, p < 0.0001 (125).

Беше направен корелационен анализ за общата преживяемост и свободната от заболяване преживяемост на пациентктите според експресията на маркерите GA733-2, Muc1, Her2 и CK19, hMAM, CD24. При анализа за общата преживяемост, резултатите показват, че наличието на циркулиращи туморни клетки при болни с метастазирал рак на гърдата е свързано с по-лоша прогноза. Има статистически значима разлика между пациенки с ЦТК и тези без ЦТК по отношение на ОП (p=0,04). При направения статистически анализ за свободната от заболяване преживяемост не беше открита статистически значима разлика (p=0,808) между групите с и без ЦТК. Открито беше, че експресията на GA733-2 и Muc1 (p=0,04 за двете) в ЦТК преди иницииране на адювантна терапия са статистически значими и са показателни за по-ниска преживяемост. Резултатите показват, че експресията на hMAM (p=0,012) в ЦТК преди иницииране на адювантна терапия е показателна за по-ниска преживяемост и е статистически значима. За маркерите Her2 и CK19 не беше открита статистически значима (p= 0,995 и p= 0,349 съотв.) разлика между групите с и без маркера.

Bölke и съавтори (126) изследват пациенти с метастазирал рак на гърдата за няколко биомаркера в ЦТК и откриват,че GA733-2 свръхекспресия се наблюдава при 12.7% от случаите, MUC1- в 15.9% от случаите, hMAM- 9.1% и *spdef* в 12.1% (последните 2 са изследвани за експресията с RT-PCR). В това проучване експресията на HER2 няма статистическа значимост при болните с рак на гърдата. Значима корелация е установена за GA733-2 и за MUC1, а при мултимаркерния анализ е установена корелация с рака на гърдата със следните комбинациите - GA733-2/ MUC1 и GA733-2/ MUC1/ hMAM/ *spdef* които могат да служат като маркери за определяне на наличието на циркулиращи туморни клетки при болни с рак на гърдата, като използването на мултимаркерни тестове повишава специфичността на метода .

Ракът на гърдата е на първо място по честота при жените и представлява 26.4% от всички злокачествени заболявания при тях. Процентното разпределение на най-честата причина за смърт от злокачествени заболявания при жените в България за 2012 г. е рака на гърдата - 18,3%. През 2012 г. са регистрирани 3923 нови случаи и са починали 1364 жени .Заболяемостта се увеличава с 1.8% средногодишно, смъртността остава без статистически значима промяна. Увеличената заболеваемост от рак на гърдата определя и нуждата от осъвременяване на клиничните и молекулярно-генетичните средства за диагностициране, лечение и проследяване на заболяването. Диагностичните подходи, които определят прогнозата за пациентите с рак на гърдата имат нужда от подобрения. Нови техники за изследването като генното профилиране и генната експресия на тумор асоциирани гени могат да спомогнат за установяването на нови прогностични маркери в клиничните проучвания. Освен това моделите на генна експресия в ЦТК могат да дадат информация за механизмите на метастазиране на туморите в организма.

VI. Изводи:

1. Секвенирането с платформата Ion Torrent PGM при използване на Ion AmpliSeq™ BRCA1/2 Community Panel е бърз и надежден метод за генетичен анализ на BRCA гените с 98% специфичност, 100% чувствителност;

2. Разработеният алгоритъм за откриване на мутации в BRCA гените със секвениране от ново поколение е по-бърз и високопродуктивен алтернативен метод на класическото секвениране по Sanger за диагностика на фамилния рак на гърдата и яйчниците;

3. Анализът на панел от тумор-асоциирани гени (TruSight Cancer) с платформа MiSeq позволи откриването на вероятна генетичната причина за възникване на заболяването при 35.5% от изследваните пациентки с негативен BRCA1/2 мутационен статус, което показва необходимостта от използването на панелно секвениране в диагностичната практика на тези заболявания;

4. При част от пациентите с фамилен рак на гърдата и яйчниците (27.3% от изследваните пациентки с мутации), се откриват патогенни варианти в два различни тумор-асоциирани гени (двойна хетерозиготност), което допълнително потвърждава необходимостта от изследването на панели от гени за диагностика и оценка на риска;

5. Установеният профил на най-чести соматични мутации в PIK3CA, ERBB2, APC, ATM и TP53 в изследваната група тумори на български пациенти с рак на гърдата се различава от този в базите данни, което потвърждава необходимостта от повече проучвания в тази насока;

6. На базата на анализирания спектър от соматични мутации могат да се отграничат няколко подгрупи със сходни молекулни профили в рамките на основните хистологични подтипове тумори, което може да се използва за прецизиране на терапията;

7. Наличието на циркулиращи туморни клетки при болни с метастазирал рак на гърдата, експресията на Muc1 ($p=0,04$) и hMAM ($p=0,012$) в ЦТК преди иницииране на адювантна терапия са статистически значими предиктивни биомаркери за лоша прогноза;

8. Мултивариационният регресионен анализ на клиничните показатели показа, че единствено възрастта има статистическа значимост като независим прогностичен фактор, свързан с лоша прогноза (HR=1.060);

9. Общо 40% от пациентките с метастатичен рак на гърдата показват различие в експресионния статус на Her2 рецептора при първичния тумор и този на произлизащите от него циркулиращи туморни клетки, което показва необходимостта от молекулно профилиране на ЦТК преди терапията;

10. Наличието на данни за промяна на експресионните профили на ЦТК в хода на терапията може да бъде използвано за прецизиране на схемата за лечение на пациентки с с метастатичен рак на гърдата.

VII. Приноси

Методични приноси

- ✓ Валидиран беше метод за новогенерационно секвениране с Ion Torrent™ PGM платформата и AmpliSeqTM BRCA1/2 Community Panel и беше разработен бърз и ефективен биоинформатичен алгоритъм за надеждно определяне на всички варианти;

- ✓ За първи път в България беше използван метод за новогенерационно секвениране на панел от 94 тумор-асоциирани гени при BRCA негативни пациенти с рак на гърдата;

- ✓ За първи път в България беше използван метод за новогенерационно секвениране за търсене на соматични мутации в тумори на пациенти с рак на гърдата;

- ✓ За първи път в България беше въведен метода на изолиране и качествен анализ на циркулиращи туморни клетки Adna Test за проследяването на лечението на пациентки с метастазирал рак на гърдата.

Научно-фундаментални приноси

- ✓ Открити бяха 3 нови мутации, неописани в литературата - два frameshift варианта-c.9909delA в екзон 27a на BRCA2 и c.5697delCCAAGGG в екзон 22 на BRCA1, една миссенс- замяна c. 285T>C в екзон 2 на BRCA1;

- ✓ Бяха открити 1 нова frameshift мутация в гена ATM и 6 нови вероятно патогенни герминативни миссенс мутации в гените PTCH1, RAD51C, MET, MUTYH, ATM и CHEK2;

- ✓ Бяха открити 11 нови за базите данни потенциално патогенни соматични мутации в гените PIK3CA, ERBB2, APC, ATM, TP53, ERBB4, PTEN, KRAS, FGFR1, RB1;

Научно-приложен принос

- ✓ Беше създадена тъканна банка от 91 туморни проби получени чрез ексцизионна биопсия на пациенти с рак на гърдата и ДНК банка в Център по Молекулна Медицина.

VIII. Публикации и участия в конгреси и проекти

8.1. Публикации свързани с дисертационния труд

1. **Daniela Dacheva**, Rumyana Dodova, Ivan Popov, Teodora Goranova, Atanaska Mitkova, Vanio Mitev and Radka Kaneva Validation of an NGS approach for diagnostic BRCA1/BRCA2 mutation testing Molecular diagnosis and therapy IF 2.589 Цитирания- Scopus:8

2. Rumyana Ivanova Dodova, Atanaska Velichkova Mitkova, **Daniela Rosenova Dacheva**, Lina Basam Hadjo, Alexandrina Ivanova Vlahova3 Margarita Stoyanova Taushanova - Hadjieva Spartak Stoyanov Valev, Marija Mitko Caulevska, Stanislava Dimitrova Popova, Ivan Emilov Popov, Tihomir Iliichev Dikov, Theophil Angelov Sedloev, Atanas Stefanov Ionkov, Konstanta Velinova Timcheva, Svetlana LiubomirovaChristova, Ivo Marinov Kremensky, Vanio Ivanov Mitev and Radka Petrova Kaneva Spectrum and frequencies of BRCA1/2 mutations in Bulgarian high risk breast cancer patients. BMC cancer; IF 3.32 Цитирания- Scopus:1

3. С. Вълев, **Д. Дачева**, А. Миткова, М. Таушанова, В. Митев, К. Тимчева. Циркулиращи туморни клетки при рак на млечната жлеза. Приложение на молекулярните методи в клиничната практика. Обзори по онкология 2013; Брой 1, студия 2, стр. 39-60

8.2. Участия в конгреси

- **Dacheva D**, Dodova R, Mitkova A, Kamenarova K, Tzveova R, Popov I, Vlahova A, Taushanova-Hadjieva M, Valev S, Dikov T, Timcheva K, Christova S, Mitev V, Kaneva R. Exploration of the diagnostic utility of next-generation sequencing with TruSight cancer panel for BRCA negative hereditary breast and ovarian cancer patients. " San Antonio Breast Cancer Symposium", San Antonio, Texas, USA, December 8th-12th. Poster presentation.
- **Dacheva Daniela**, Vasileva Mariela, Sedloev Theophil, Kamenarova Kunka, Tzveova Reni, Mitkova Atanaska, Kaneva Radka, Mitev Vanio. Exploring the somatic mutation spectrum through next-generation sequencing in Bulgarian breast cancer patients. 11th Balkan Congress of Human Genetics, 17th-20th September 2015, Belgrade, Serbia, oral presentation, abstract on page 20;
- **D. Dacheva**, S. Valev, M. Taushanova, K. Timcheva, V. Mitev, R. Kaneva, A. Mitkova. Gene expression analysis of five tumor-associated markers in CTC isolated from Bulgarian metastatic breast cancer patients. EACR-AACR-SIC Special Conference, 20-23 June 2015, Florence, Italy, Abstract № 646, p.169

Atanaska Mitkova, Rumyana Dodova, **Daniela Pencheva**, Alexandrina Vlahova, Margarita Taushanova - Hadjieva, Spartak Valev, Konstanta Timcheva, Svetlana Christova, Vanio Mitev, Radka Kaneva. Mutation screening of Bulgarian Hereditary Breast and Ovarian Cancer patients with multi-gene cancer panel. 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 9-12 July 2016, Manchester, UK. Poster presentation. European Journal of Cancer, Volume 61, Supplement 1, July 2016, P206, p.S37

- Rumyana Dodova, Atanaska Mitkova, **Daniela Pencheva**, Spartak Valev, Margarita Taushanova Alan Nachev, Konstanta Timcheva, Roumen Dimitrov, Vanio Mitevand Radka Kaneva. Molecular-genetic analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Bulgarian patients with Hereditary Breast Ovarian Cancer (HBOC) syndrome. 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 9-12 July 2016, Manchester, UK. Poster presentation. European Journal of Cancer, Volume 61, Supplement 1, July 2016, P282, p.S53
- Vasileva M., T. Sedloev, K. Angelov, **D. Dacheva**, R. Dodova, A. Mitkova, A. Vlahova, T. Dikov, G. Velev, S. Masliankov, R. Kaneva, S. Hristova, V. Pavlov, G. Todorov. Annual report of Medical University of Sofia Breast Cancer Biobank. 5th Turkish-Bulgarian Breast & Endocrine surgery club meeting; 27-28 May 2015, Varna, Bulgaria; p.22-26
- **Д. Дачева**; Циркулиращи туморни клетки при рак на гърдата; Молекулярна диагностика, геномика и епигенетика в медицинската онкология; регионална среща на сдружение „Млад Онколог"; 28 март 2015; София; устна презентация
- **D. Dacheva**, I. Popov, R. Dodova, T. Goranova, A. Mitkova, R. Kaneva, V. Mitev; Comparison of two library construction strategies for targeted resequencing of BRCA1/2 genes in Bulgarian breast cancer patients on NGS platform; Poster presentation; EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH; 5-8 July 2014; Munich, Germany, European Journal of Cancer, Volume 50, Supplement 5, July 2014, P432, p.S103
- R. Dodova, A. Mitkova, **D. Dacheva**, M. Taushanova, S. Valev , A. Vlahova, T. Dikov, C. Timcheva, S. Christova, R. Kaneva; Recurrent BRCA1/2 mutations in Bulgarian patients with hereditary breast and ovarian cancer; Poster presentation; EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH; 5-8 July 2014; Munich, Germany, European Journal of Cancer, Volume 50, Supplement 5, July 2014, P583, p.S140

- **Д. Дачева**; Циркулиращи туморни клетки и ДНК. Приложение за проследяване на ефекта от терапия на онкологични заболявания; Първа национална конференция „Молекулярна патология в онкологията”; 6-7 Юни 2014; устна презентация
- **D. Dacheva**, S. Valev, M. Taushanova, V. Mitev, K. Timcheva, R. Kaneva, A. Mitkova; Monitoring circulating tumour cells in the course of therapy of Bulgarian patients with metastatic breast cancer. European Breast Cancer Conferences, 19- 21 March 2014, Glasgow, Scotland. European Journal of Cancer, Volume 50, Supplement 2 (electronic publication only), March 2014, P252, page S116
- R. Dodova, **D. Dacheva**, M. Taushanova, S. Valev, Z. Kamburova, K. Kovacheva, C. Timcheva, S. Christova, A. Mitkova, R. Kaneva; BRCA1/2 mutation screening in Bulgarian patients with triple negative breast cancer. European Breast Cancer Conferences, 19- 21 March 2014, Glasgow, Scotland. European Journal of Cancer, Volume 50, Supplement 2 (electronic publication only), March 2014, P243, page S114
- **D. Dacheva**, S. Valev, M. Taushanova, V. Mitev, K. Timcheva, R. Kaneva, A. Mitkova; Qualitative analysis of the CTC levels in patients with metastatic breast cancer. The European Human Genetics Conference, 08-11 June 2013, Paris, France. /Eur J Hum Genet, Volume 21, Supplement 2, June 2013, P11.041, page 274.
- I. Popov, **D. Dacheva**, R. Dodova, T. Goranova, A. Mitkova, R. Kaneva, V. Mitev; Variant discovery in BRCA1 and BRCA2: Comparison of the efficiency of NextGENe software and the Torrent Suite Variant Caller plugin. The European Human Genetics Conference, 08-11 June 2013, Paris, France. /Eur J Hum Genet, Volume 21, Supplement 2, June 2013, P16.001, page 365.
- **Daniela Dacheva**, Rumyana Dodova, Atanaska Mitkova, Aleksandrina Vlahova, Tihomir Dikov, Spartak Valev, Constanta Timcheva, Svetlana Christova, Vanio Mitev, and Radka Kaneva. Mutation screening of BRCA2 exon 11 and exon 17 in Bulgarian breast cancer patients. Poster presentation. The European Association for Cancer Research, 7-10 July 2012, Barcelona, Spain.
- Rumyana Dodova, **Daniela Dacheva**,, Aleksandrina Vlahova, Tihomir Dikov, Svetlana Christova, Spartak Valev, Margarita Taushanova, Constanta Timcheva, Radka Kaneva and Atanaska Mitkova. Mutation screening of BRCA1 gene in Bulgarian breast cancer patients Poster presentation. The European Association for Cancer Research, 7-10 July 2012, Barcelona, Spain.
- **Daniela Dacheva**, Rumyana Dodova, Aleksandrina Vlahova, Tihomir Dikov, Svetlana Christova, Spartak Valev, Constanta Timcheva, Vanio Mitev, Radka Kaneva and Atanaska Mitkova. Mutation screening of BRCA2 exons 11 in Bulgarian breast cancer patients. Poster presentation. The European Human Genetics Conference, 28-31 May 2011, Amsterdam, The Netherlands.
- Rumyana Dodova, **Daniela Dancheva**, Aleksandrina Vlahova, Tihomir Dikov, Svetlana Hristova, Spartak Valev, Constanta Timcheva, Vanio Mitev, Radka Kaneva, and Atanaska Mitkova. Large genomic aberrations in BRCA1 and BRCA2 genes in Bulgarian breast cancer patients. Poster presentation. The European Human Genetics Conference, 28-31 May 2011, Amsterdam, The Netherlands.
- Rumyana Dodova, Atanaska Mitkova, **Daniela Dacheva**, Marija Caulevska, Aleksandrina Vlahova, Tihomir Dikov, Spartak Valev, Margarita Taushanova, Constanta Timcheva, Vanio Mitev, Radka Kaneva and Svetlana Christova. BRCA mutation screening in

Bulgarian breast cancer patients. Poster presentation European Congress of Pathology (ECP) 27 August - 01 September 2011, Helsinki, Finland

8.3. Участия с проекти:

2013-2014 Експресионен анализ на молекулни маркери в циркулиращи туморни клетки (ЦТК) от периферна кръв при български пациентки с метастазирал карцином на гърдата. Ръководител на проекта

2014-2015 Анализ на спектъра от соматични мутации в тумори от български пациенти с рак на гърдата чрез секвениране от ново поколение. Ръководител на проекта

2015-2016 Анализ за наличие на герминативни мутации в панел от 94 тумор-асоциирани гени чрез новогенерационно секвениране при български пациенти с фамилен рак на гърдата. Ръководител на проекта

2016-2017 Анализ на соматични мутации при български пациенти с колоректални и стомашни карциноми чрез секвениране от ново поколение на панел от тумор-асоциирани гени

2016-2017 Съхранение на тъкани за доразширяване на тъканна, плазмена и ДНК банка от пациенти с рак на гърдата

2014-2015 Валидиране на протокол за секвениране от следващо поколение със секвенатор IonTorrent PGM за откриване на мутации в BRCA1 и BRCA2 гените.

2014-2015 Молекулярно-генетичен анализ за носителство на мутации в BRCA1 и BRCA2 гените при пациентки с овариален карцином;

2013-2014 Молекулярно-генетичен анализ на гени с междинна пенетрантност при BRCA негативни пациентки с фамилен карцином на гърдата;

2013-2014 Проучване върху честотата на големи геномни пренареждания в BRCA1 и BRCA2 гените сред пациентки с фамилен рак на млечната жлеза ;

2012-2013 Проучване върху честотата на носителство на генетични дефекти в BRCA1 и BRCA2 гените при фамилни случаи на рак на млечнта жлеза

;2011-2012 Анализ на мутациите в BRCA1 гена при български пациенти с тройнонегативен карцином на гърдата;

2010-2013 Проследяване на нивата на циркулиращи туморни клетки (ЦТК) при болни с метастазирал карцином на гърдата- прогностично и предиктивно значение

IX Библиография:

1. NCCN - Evidence-Based Cancer Guidelines, Oncology Drug Compendium, Oncology Continuing Medical Education [Internet]. [cited 2017 May 5]. Available from: https://www.nccn.org/

2. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. Am J Hum Genet. 2003 May 1;72(5):1117–30.

3. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2007 Apr 10;25(11):1329–33.

4. Costa JL, Sousa S, Justino A, Kay T, Fernandes S, Cirnes L, et al. Nonoptical massive parallel DNA sequencing of BRCA1 and BRCA2 genes in a diagnostic setting. Hum Mutat. 2013 Apr;34(4):629–35.

5. Bosdet IE, Docking TR, Butterfield YS, Mungall AJ, Zeng T, Coope RJ, et al. A clinically validated diagnostic second-generation sequencing assay for detection of hereditary BRCA1 and BRCA2 mutations. J Mol Diagn JMD. 2013 Nov;15(6):796–809.

6. Tarabeux J, Zeitouni B, Moncoutier V, Tenreiro H, Abidallah K, Lair S, et al. Streamlined ion torrent PGM-based diagnostics: BRCA1 and BRCA2 genes as a model. Eur J Hum Genet. 2014 Apr;22(4):535–41.

7. Bragg LM, Stone G, Butler MK, Hugenholtz P, Tyson GW. Shining a Light on Dark Sequencing: Characterising Errors in Ion Torrent PGM Data. PLOS Comput Biol. 2013 Apr 11;9(4):e1003031.

8. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. BMC Genomics. 2012 Jul 24;13:341.

9. Larsen MJ, Thomassen M, Gerdes A-M, Kruse TA. Hereditary Breast Cancer: Clinical, Pathological and Molecular Characteristics. Breast Cancer Basic Clin Res. 2014 Oct 15;8:145–55.

10. Daly MB, Axilbund JE, Buys S, Crawford B, Farrell CD, Friedman S, et al. Genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian. J Natl Compr Cancer Netw JNCCN. 2010 May;8(5):562–94.

11. Cantor SB, Guillemette S. Hereditary breast cancer and the BRCA1-associated FANCJ/BACH1/BRIP1. Future Oncol Lond Engl. 2011 Feb;7(2):253–61.

12. Filippini SE, Vega A. Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2. Front Biosci Landmark Ed. 2013 Jun 1;18:1358–72.

13. Thompson D, Duedal S, Kirner J, McGuffog L, Last J, Reiman A, et al. Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. J Natl Cancer Inst. 2005 Jun 1;97(11):813–22.

14. Mangone FR, Miracca EC, Feilotter HE, Mulligan LM, Nagai MA. ATM gene mutations in sporadic breast cancer patients from Brazil. SpringerPlus [Internet]. 2015 Jan 15 [cited 2017 Apr 11];4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4298590/

15. Khalil HS, Tummala H, Zhelev N. ATM in focus: a damage sensor and cancer target. 2012 Nov 30 [cited 2017 Apr 11]; Available from: https://repository.abertay.ac.uk/jspui/handle/10373/1625

16. Tavera-Tapia A, Pérez-Cabornero L, Macías JA, Ceballos MI, Roncador G, de la Hoya M, et al. Almost 2% of Spanish breast cancer families are associated to germline pathogenic mutations in the ATM gene. Breast Cancer Res Treat. 2017 Feb;161(3):597–604.

17. Renwick A, Thompson D, Seal S, Kelly P, Chagtai T, Ahmed M, et al. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. Nat Genet. 2006 Aug;38(8):873–5.

18. Out AA, Wasielewski M, Huijts PEA, van Minderhout IJHM, Houwing-Duistermaat JJ, Tops CMJ, et al. MUTYH gene variants and breast cancer in a Dutch case–control study. Breast Cancer Res Treat. 2012 Jul;134(1):219–27.

19. Osorio A, Milne RL, Kuchenbaecker K, Vaclová T, Pita G, Alonso R, et al. DNA Glycosylases Involved in Base Excision Repair May Be Associated with Cancer Risk in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. PLOS Genet. 2014 Apr 3;10(4):e1004256.

20. Maxwell KN, Wubbenhorst B, D'Andrea K, Garman B, Long JM, Powers J, et al. Prevalence of mutations in a panel of breast cancer susceptibility genes in BRCA1/2-negative patients with early-onset breast cancer. Genet Med Off J Am Coll Med Genet. 2015 Aug;17(8):630–8.

21. Nevanlinna H, Bartek J. The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. Oncogene. 2006 Sep 25;25(43):5912–9.

22. Ahn J, Urist M, Prives C. The Chk2 protein kinase. DNA Repair. 2004 Sep;3(8–9):1039–47.

23. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, et al. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. Science. 1996 Jun 14;272(5268):1668–71.

24. Naylor TL, Greshock J, Wang Y, Colligon T, Yu Q, Clemmer V, et al. High resolution genomic analysis of sporadic breast cancer using array-based comparative genomic hybridization. Breast Cancer Res. 2005;7(6):R1186–98.

25. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science. 2006 Oct 13;314(5797):268–74.

26. Kasper M, Jaks V, Fiaschi M, Toftgård R. Hedgehog signalling in breast cancer. Carcinogenesis. 2009 Jun;30(6):903–11.

27. Lu W, Wang X, Lin H, Lindor NM, Couch FJ. Mutation screening of RAD51C in high-risk breast and ovarian cancer families. Fam Cancer. 2012 Sep;11(3):381–5.

28. Stevens KN, Vachon CM, Lee AM, Slager S, Lesnick T, Olswold C, et al. Common breast cancer susceptibility loci are associated with triple-negative breast cancer. Cancer Res. 2011 Oct 1;71(19):6240–9.

29. Somyajit K, Subramanya S, Nagaraju G. Distinct roles of FANCO/RAD51C protein in DNA damage signaling and repair: implications for Fanconi anemia and breast cancer susceptibility. J Biol Chem. 2012 Jan 27;287(5):3366–80.

30. Ho-Yen CM, Jones JL, Kermorgant S. The clinical and functional significance of c-Met in breast cancer: a review. Breast Cancer Res BCR [Internet]. 2015 [cited 2017 Apr 11];17(1). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4389345/

31. Lengyel E, Prechtel D, Resau JH, Gauger K, Welk A, Lindemann K, et al. C-Met overexpression in node-positive breast cancer identifies patients with poor clinical outcome independent of Her2/neu. Int J Cancer. 2005 Feb 10;113(4):678–82.

32. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. Science. 2007 May 18;316(5827):1039–43.

33. Salgia R. Role of c-Met in Cancer: Emphasis on Lung Cancer. Semin Oncol. 2009 Apr;36(2 Suppl 1):S52–8.

34. Sugimoto M. A cascade leading to premature aging phenotypes including abnormal tumor profiles in Werner syndrome (review). Int J Mol Med. 2014 Feb;33(2):247–53.

35. Goto M, Miller RW, Ishikawa Y, Sugano H. Excess of rare cancers in Werner syndrome (adult progeria). Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol. 1996 Apr;5(4):239–46.

36. Bogliolo M, Schuster B, Stoepker C, Derkunt B, Su Y, Raams A, et al. Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. Am J Hum Genet. 2013 May 2;92(5):800–6.

37. Kashiyama K, Nakazawa Y, Pilz DT, Guo C, Shimada M, Sasaki K, et al. Malfunction of nuclease ERCC1-XPF results in diverse clinical manifestations and causes Cockayne syndrome, xeroderma pigmentosum, and Fanconi anemia. Am J Hum Genet. 2013 May 2;92(5):807–19.

38. Ghoussaini M, Pharoah PDP, Easton DF. Inherited genetic susceptibility to breast cancer: the beginning of the end or the end of the beginning? Am J Pathol. 2013 Oct;183(4):1038–51.

39. Hofstatter EW, Domchek SM, Miron A, Garber J, Wang M, Componeschi K, et al. PALB2 mutations in familial breast and pancreatic cancer. Fam Cancer [Internet]. 2011 Jun [cited 2017 May 3];10(2). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3836668/

40. Sy SM-H, Huen MSY, Zhu Y, Chen J. PALB2 regulates recombinational repair through chromatin association and oligomerization. J Biol Chem. 2009 Jul 3;284(27):18302–10.

41. Trapani JA. Target cell apoptosis induced by cytotoxic T cells and natural killer cells involves synergy between the pore-forming protein, perforin, and the serine protease, granzyme B. Aust N Z J Med. 1995 Dec;25(6):793–9.

42. Tschopp J, Masson D, Stanley KK. Structural/functional similarity between proteins involved in complement- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytolysis. Nature. 1986 Sep 28;322(6082):831–4.

43. Xiao F, Lu M, Li J, Zhao T, Yi SY, Thara VK, et al. Pto Mutants Differentially Activate Prf-Dependent, avrPto-Independent Resistance and Gene-for-Gene Resistance. Plant Physiol. 2003 Mar;131(3):1239–49.

44. Martínez-Pomar N, Lanio N, Romo N, Lopez-Botet M, Matamoros N. Functional impact of A91V mutation of the PRF1 perforin gene. Hum Immunol. 2013 Jan;74(1):14–7.

45. Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM, Milbrandt J. The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. Curr Opin Neurobiol. 2000 Feb;10(1):103–10.

46. Qi X-P, Ma J-M, Du Z-F, Ying R-B, Fei J, Jin H-Y, et al. RET germline mutations identified by exome sequencing in a Chinese multiple endocrine neoplasia type 2A/familial medullary thyroid carcinoma family. PloS One. 2011;6(5):e20353.

47. Rett Syndrome: What Are the Symptoms and How is it Treated? [Internet]. WebMD. [cited 2017 May 3]. Available from: http://www.webmd.com/brain/autism/rett-syndrome

48. Morandi A, Martin L-A, Gao Q, Pancholi S, Mackay A, Robertson D, et al. GDNF-RET signaling in ER-positive breast cancers is a key determinant of response and resistance to aromatase inhibitors. Cancer Res. 2013 Jun 15;73(12):3783–95.

49. Spanheimer PM, Park J-M, Askeland RW, Kulak MV, Woodfield GW, De Andrade JP, et al. Inhibition of RET increases the efficacy of antiestrogen and is a novel treatment strategy for luminal breast cancer. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2014 Apr 15;20(8):2115–25.

50. Gattelli A, Nalvarte I, Boulay A, Roloff TC, Schreiber M, Carragher N, et al. Ret inhibition decreases growth and metastatic potential of estrogen receptor positive breast cancer cells. EMBO Mol Med. 2013 Sep;5(9):1335–50.

51. Neumann HPH, Pawlu C, Peczkowska M, Bausch B, McWhinney SR, Muresan M, et al. Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. JAMA. 2004 Aug 25;292(8):943–51.

52. Kim S, Kim DH, Jung W-H, Koo JS. Succinate dehydrogenase expression in breast cancer. SpringerPlus. 2013 Dec;2(1):299.

53. Chen L, Liu T, Zhang S, Zhou J, Wang Y, Di W. Succinate dehydrogenase subunit B inhibits the AMPK-HIF-1α pathway in human ovarian cancer in vitro. J Ovarian Res. 2014 Dec 10;7:115.

54. Georgitsi M, Karhu A, Winqvist R, Visakorpi T, Waltering K, Vahteristo P, et al. Mutation analysis of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene in colorectal, breast, and prostate cancers. Br J Cancer. 2007 Jan 29;96(2):352–6.

55. Nord KH, Magnusson L, Isaksson M, Nilsson J, Lilljebjörn H, Domanski HA, et al. Concomitant deletions of tumor suppressor genes MEN1 and AIP are essential for the pathogenesis of the brown fat tumor hibernoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Dec 7;107(49):21122–7.

56. Igreja S, Chahal HS, King P, Bolger GB, Srirangalingam U, Guasti L, et al. Characterization of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) mutations in familial isolated pituitary adenoma families. Hum Mutat. 2010 Aug;31(8):950–60.

57. Couch FJ, Hart SN, Sharma P, Toland AE, Wang X, Miron P, et al. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2015 Feb 1;33(4):304–11.

58. Buys SS, Sandbach JF, Gammon A, Patel G, Kidd J, Brown KL, et al. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. Cancer. 2017 Jan 13;

59. Tedaldi G, Tebaldi M, Zampiga V, Danesi R, Arcangeli V, Ravegnani M, et al. Multiple-gene panel analysis in a case series of 255 women with hereditary breast and ovarian cancer. Oncotarget. 2017 Apr 3;

60. Li J, Meeks H, Feng B-J, Healey S, Thorne H, Makunin I, et al. Targeted massively parallel sequencing of a panel of putative breast cancer susceptibility genes in a large cohort of multiple-case breast and ovarian cancer families. J Med Genet. 2016 Jan;53(1):34–42.

61. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. Am J Cancer Res. 2015 Sep 15;5(10):2929–43.

62. Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. J Cancer. 2016;7(10):1281–94.

63. Kim J-Y, Lee E, Park K, Park W-Y, Jung HH, Ahn JS, et al. Clinical implications of genomic profiles in metastatic breast cancer with a focus on TP53 and PIK3CA, the most frequently mutated genes. Oncotarget. 2017 Mar 3;

64. Sharma VR, Gupta GK, Sharma AK, Batra N, Sharma DK, Joshi A, et al. PI3K/Akt/mTOR Intracellular Pathway and Breast Cancer: Factors, Mechanism and Regulation. Curr Pharm Des. 2016 Nov 16;

65. Cascón A, Robledo M. MAX and MYC: A Heritable Breakup. Cancer Res. 2012 Jul 1;72(13):3119–24.

66. Mukohara T. PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. Breast Cancer Targets Ther. 2015 May 15;7:111–23.

67. Arsenic R, Lehmann A, Budczies J, Koch I, Prinzler J, Kleine-Tebbe A, et al. Analysis of PIK3CA mutations in breast cancer subtypes. Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM. 2014 Jan;22(1):50–6.

68. Zardavas D, Phillips WA, Loi S. PIK3CA mutations in breast cancer: reconciling findings from preclinical and clinical data. Breast Cancer Res. 2014;16:201.

69. Cizkova M, Susini A, Vacher S, Cizeron-Clairac G, Andrieu C, Driouch K, et al. PIK3CAmutation impact on survival in breast cancer patients and in ERα, PR and ERBB2-based subgroups. Breast Cancer Res. 2012;14:R28.

70. Ma CX. The PI3K Pathway as a Therapeutic Target in Breast Cancer. Am J Hematol Oncol [Internet]. 2015 Mar 20 [cited 2017 Apr 12];11(3). Available from: http://www.gotoper.com/publications/ajho/2015/2015mar/the-pi3k-pathway-as-a-therapeutic-target-in-breast-cancer

71. Papaxoinis G, Kotoula V, Alexopoulou Z, Kalogeras KT, Zagouri F, Timotheadou E, et al. Significance of PIK3CA Mutations in Patients with Early Breast Cancer Treated with Adjuvant Chemotherapy: A Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) Study. PLOS ONE. 2015 Oct 9;10(10):e0140293.

72. Tan M, Yu D. Molecular Mechanisms of ErbB2-Mediated Breast Cancer Chemoresistance [Internet]. Landes Bioscience; 2013 [cited 2017 May 3]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6194/

73. Padhy LC, Shih C, Cowing D, Finkelstein R, Weinberg RA. Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of rat neuroblastomas. Cell. 1982 Apr;28(4):865–71.

74. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. Cell. 1986 Jun 6;45(5):649–57.

75. Breast Cancer HER2 Status [Internet]. [cited 2017 May 3]. Available from: https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-her2-status.html

76. Bozhanov SS, Angelova SG, Krasteva ME, Markov TL, Christova SL, Gavrilov IG, et al. Alterations in p53, BRCA1, ATM, PIK3CA, and HER2 genes and their effect in modifying clinicopathological characteristics and overall survival of Bulgarian patients with breast cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2010 Nov;136(11):1657–69.

77. Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. Chemother Res Pract. 2012;2012:743193.

78. Herter-Sprie GS, Greulich H, Wong K-K. Activating Mutations in ERBB2 and Their Impact on Diagnostics and Treatment. Front Oncol [Internet]. 2013 Apr 23 [cited 2017 Apr 12];3. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3632856/

79. Sun Z, Shi Y, Shen Y, Cao L, Zhang W, Guan X. Analysis of different HER- 2 mutations in breast cancer progression and drug resistance. J Cell Mol Med. 2015 Dec;19(12):2691–701.

80. Sundvall M, Iljin K, Kilpinen S, Sara H, Kallioniemi O-P, Elenius K. Role of ErbB4 in Breast Cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2008 Jun 1;13(2):259–68.

81. Wnt Pathway-Independent Activities of the APC Tumor Suppressor pp. 105-132 [Internet]. [cited 2017 Apr 13]. Available from: https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=24188

82. Prasad CP, Mirza S, Sharma G, Prashad R, DattaGupta S, Rath G, et al. Epigenetic alterations of CDH1 and APC genes: relationship with activation of Wnt/beta-catenin pathway in invasive ductal carcinoma of breast. Life Sci. 2008 Aug 29;83(9–10):318–25.

83. Mukherjee N, Bhattacharya N, Alam N, Roy A, Roychoudhury S, Panda CK. Subtype-specific alterations of the Wnt signaling pathway in breast cancer: clinical and prognostic significance. Cancer Sci. 2012 Feb;103(2):210–20.

84. Ahmed M, Rahman N. ATM and breast cancer susceptibility. Oncogene. 2006 Sep 25;25(43):5906–11.

85. VanKlompenberg MK, Bedalov CO, Soto KF, Prosperi JR. APC selectively mediates response to chemotherapeutic agents in breast cancer. BMC Cancer [Internet]. 2015 Jun 7 [cited 2017 Apr 13];15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4458029/

86. Swift M, Reitnauer PJ, Morrell D, Chase CL. Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. N Engl J Med. 1987 May 21;316(21):1289–94.

87. COSMIC: Cancer Browser [Internet]. [cited 2017 May 4]. Available from: http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue#sn=breast&ss=all&hn=all&sh=all&in=t&src=tissue&all_data=n&wgs=off

88. Jaeger BAS, Jueckstock J, Andergassen U, Salmen J, Schochter F, Fink V, et al. Evaluation of Two Different Analytical Methods for Circulating Tumor Cell Detection in Peripheral Blood of Patients with Primary Breast Cancer. BioMed Res Int [Internet]. 2014 [cited 2017 Apr 18];2014. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3997081/

89. Xenidis N, Ignatiadis M, Apostolaki S, Perraki M, Kalbakis K, Agelaki S, et al. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2009 May 1;27(13):2177–84.

90. Rack BK, Schindlbeck C, Andergassen U, Schneeweiss A, Zwingers T, Lichtenegger W, et al. Use of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy to predict risk for relapse: The SUCCESS trial. J Clin Oncol [Internet]. 2010 [cited 2017 Apr 18];28:15s(suppl; abstr 1003). Available from: http://meetinglibrary.asco.org/content/53775-74

91. Pierga J-Y, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de Cremoux P, Nos C, Blin N, et al. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2004 Feb 15;10(4):1392–400.

92. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. N Engl J Med. 2004 Aug 19;351(8):781–91.

93. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2005 Mar 1;23(7):1420–30.

94. Cristofanilli M, Broglio KR, Guarneri V, Jackson S, Fritsche HA, Islam R, et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden. Clin Breast Cancer. 2007 Feb;7(6):471–9.

95. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4218–24.

96. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC, et al. Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2006 Nov 1;12(21):6403–9.

97. Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, Mackay W, Moss TJ, Ciobanu N, et al. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. Blood. 1993 Nov 1;82(9):2605–10.

98. Aurilio G, Sciandivasci A, Munzone E, Sandri MT, Zorzino L, Cassatella MC, et al. Prognostic value of circulating tumor cells in primary and metastatic breast cancer. Expert Rev Anticancer Ther. 2012 Feb;12(2):203–14.

99. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. J Cell Biol. 1994 Apr 2;125(2):437–46.

100. Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. Nat Cell Biol. 2009 Feb;11(2):162–71.

101. Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M, Hannun YA, et al. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. Cancer Res. 2004 Aug 15;64(16):5818–24.

102. Litvinov SV, van Driel W, van Rhijn CM, Bakker HA, van Krieken H, Fleuren GJ, et al. Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. Am J Pathol. 1996 Mar;148(3):865–75.

103. Münz M, Kieu C, Mack B, Schmitt B, Zeidler R, Gires O. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. Oncogene. 2004 Jul 29;23(34):5748–58.

104. Armstrong A, Eck SL. EpCAM: A new therapeutic target for an old cancer antigen. Cancer Biol Ther. 2003 Aug;2(4):320–6.

105. Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Peat N, Burchell J, et al. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. J Biol Chem. 1990 Sep 5;265(25):15286–93.

106. Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. Nat Rev Cancer. 2004 Jan;4(1):45–60.

107. Moncada DM, Kammanadiminti SJ, Chadee K. Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. Trends Parasitol. 2003 Jul;19(7):305–11.

108. Gendler SJ. MUC1, the renaissance molecule. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2001 Jul;6(3):339–53.

109. Kim Y-S, Won YS, Park KS, Song BJ, Kim JS, Oh SJ, et al. Prognostic Significance of HER2 Gene Amplification According to Stage of Breast Cancer. J Korean Med Sci. 2008 Jun;23(3):414–20.

110. Gajria D, Chandarlapaty S. HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. Expert Rev Anticancer Ther. 2011 Feb;11(2):263–75.

111. Arteaga CL, Engelman JA. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. Cancer Cell. 2014 Mar 17;25(3):282–303.

112. Houssami N, Macaskill P, Balleine RL, Bilous M, Pegram MD. HER2 discordance between primary breast cancer and its paired metastasis: tumor biology or test artefact? Insights through meta-analysis. Breast Cancer Res Treat. 2011 Oct;129(3):659–74.

113. Jordan NV, Bardia A, Wittner BS, Benes C, Ligorio M, Zheng Y, et al. HER2 expression identifies dynamic functional states within circulating breast cancer cells. Nature. 2016 Sep 1;537(7618):102–6.

114. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2004 Oct 15;10(20):6897–904.

115. Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. J Cell Biol. 2006 Jul 17;174(2):169–74.

116. Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. Endocr Relat Cancer. 2006 Dec;13(4):1033–67.

117. Shi J, Sugrue SP. Dissection of protein linkage between keratins and pinin, a protein with dual location at desmosome-intermediate filament complex and in the nucleus. J Biol Chem. 2000 May 19;275(20):14910–5.

118. Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Kafousi M, et al. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2008 May 1;14(9):2593–600.

119. Strati A, Markou A, Parisi C, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulias V, et al. Gene expression profile of circulating tumor cells in breast cancer by RT-qPCR. BMC Cancer. 2011 Oct 4;11:422.

120. Bidard F-C, Peeters DJ, Fehm T, Nolé F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. Lancet Oncol. 2014 Apr;15(4):406–14.

121. Huang X, Gao P, Song Y, Sun J, Chen X, Zhao J, et al. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells detected with the CellSearch System in colorectal cancer. BMC Cancer [Internet]. 2015 Mar 30 [cited 2017 Apr 27];15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4389311/

122. Vlaeminck-Guillem V. When Prostate Cancer Circulates in the Bloodstream. Diagnostics. 2015 Oct 29;5(4):428–74.

123. Punnoose EA, Atwal S, Liu W, Raja R, Fine BM, Hughes BGM, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2012 Apr 15;18(8):2391–401.

124. Hou J-M, Krebs MG, Lancashire L, Sloane R, Backen A, Swain RK, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2012 Feb 10;30(5):525–32.

125. Cabel L, Proudhon C, Gortais H, Loirat D, Coussy F, Pierga J-Y, et al. Circulating tumor cells: clinical validity and utility. Int J Clin Oncol. 2017 Feb 25;

126. Bölke E, Orth K, Gerber P, Lammering G, Mota R, Peiper M, et al. Gene expression of circulating tumour cells in breast cancer patients. Eur J Med Res. 2009 Sep 28;14(10):426–32.

Приложение 1

Открити патогенни и вероятно патогенни мутации при анализа на пациентки с рак на гърдата за соматични мутации в 48 тумор-асоциирани гени с MiSeq

ген	тип мутация	HGVSc	HGVSp	честота на срещане	rs №	COSMIC №	COSMIC локализация
PIK3CA	missense	NM_006218.2:c.2710T>G	NP_006209.2:p.Cys90Trp	7	няма	няма	няма
		NM_006218.2:c.3140A>G	NP_006209.2:p.His1047Arg	7	rs121913279	COSM775;COSM776;COSM94986;COSM94987	breast
		NM_006218.2:c.1624G>A	NP_006209.2:p.Glu542Lys	3	rs121913273	COSM125369;COSM17442;COSM760	breast
		NM_006218.2:c.1633G>A	NP_006209.2:p.Glu545Lys	3	rs104886003	COSM125370;COSM27133;COSM763	breast
		NM_006218.2:c.2102A>C	NP_006209.2:p.His701Pro	3	rs121913282	COSM778	breast
		NM_006218.2:c.331A>G	NP_006209.2:p.Lys111Glu	1	няма	COSM1041463;COSM13570	breast
		NM_006218.2:c.1634A>G	NP_006209.2:p.Glu545Gly	1	rs121913274	COSM12458;COSM297145;COSM764	breast
		NM_006218.2:c.3129G>A	NP_006209.2:p.Met1043Ile	1	rs121913283	COSM446027;COSM94984;COSM94985	breast
		NM_006218.2:c.3132T>A	NP_006209.2:p.Asn1044Lys	1	няма	COSM12592	breast
ERBB2	missense	NM_004448.2:c.2275A>C	NP_004439.2:p.Thr759Pro	11	няма	няма	няма
		няма	няма	2	rs121913470	COSM14060	breast
		NM_004448.2:c.2423A>C	NP_004439.2:p.Asp808Ala	1	няма	няма	няма
APC	missense	NM_000038.5:c.3854A>T	NP_000029.2:p.Asp1285Val	7	няма	няма	няма
		NM_000038.5:c.4266T>A	NP_000029.2:p.Asp1422Glu	5	няма	COSM1432384	other
ATM	frameshift	NM_000051.3:c.5228delC	NP_000042.3:p.Thr1743LysfsTer13	11	няма	няма	няма
	missense	NM_000051.3:c.2572T>C	NP_000042.3:p.Phe858Leu	1	rs1800056	COSM21826	other
TP53	missense	NM_000546.5:c.818G>T	NP_000537.3:p.Arg273Leu	2	rs28934576	COSM10660;COSM10779;COSM165077;COSM43896;COSM99729	breast
		NM_000546.5:c.419C>A	NP_000537.3:p.Thr140Asn	1	няма	няма	няма
		NM_000546.5:c.581T>G	NP_000537.3:p.Leu194Arg	1	няма	COSM117647;COSM117648;COSM117649;COSM117650;;;COSM43827;COSM44571	breast
		NM_000546.5:c.847C>T	NP_000537.3:p.Arg283Cys	1	rs149633775	COSM10911	breast

		NM_000546.5:c.839G>C	NP_000537.3:p.Arg280Thr	1	rs121912660, rs193920853	COSM10724;COSM10728;COSM11287;COSM129830;COSM254987;	breast
		NM_000546.5:c.19G>C	NP_000537.3:p.Asp7His	1	няма	COSM45800	other
		NM_000546.5:c.395A>G	NP_000537.3:p.Lys132Arg	1	няма	COSM11582;COSM179831;COSM179832;COSM179833;;COSM43912	breast
	stop_gained	NM_000546.5:c.637C>T	NP_000537.3:p.Arg213Ter	1	няма	COSM10654;;COSM99615;COSM99616;COSM99617;COSM99618	breast
HNF1A	frameshift	NM_000545.5:c.862delG	NP_000536.5:p.Pro291GlnfsTer51	4	няма	COSM935974	other
		NM_000545.5:c.863_864insC	NP_000536.5:p.Pro289AlafsTer28	1	няма	COSM1476243	breast
		NM_000545.5:c.865delC	NP_000536.5:p.Pro291GlnfsTer51	1	няма	COSM1359417	other
BRAF	missense	NM_004333.4:c.1399T>C	NP_004324.2:p.Ser467Pro	4	няма	COSM1448613	other
ERBB4	missense	NM_005235.2:c.2792A>T	NP_005226.1:p.Asp931Val	4	няма	няма	няма
	missense	NM_000215.3:c.2164G>A	NP_000206.2:p.Val722Ile	3	rs3213409	COSM34213	other
PTEN	frameshift	NM_000314.4:c.950_953delTACT	NP_000305.3:p.Thr319Ter	1	няма	COSM39615	breast
	frameshift	NM_000314.4:c.934_935insAC	NP_000305.3:p.Lys313ThrfsTer5	1	няма	няма	няма
	missense	NM_000314.4:c.610C>G	NP_000305.3:p.Pro204Ala	1	няма	COSM5100;COSM5279	other
RET	missense	NM_020975.4:c.2372A>T	NP_066124.1:p.Tyr791Phe	2	rs77724903	COSM1159820	other
	missense	NM_020975.4:c.1946C>T	NP_066124.1:p.Ser649Leu	1	rs148935214	няма	няма
KRAS	missense	NM_033360.2:c.51T>G	NP_203524.1:p.Ser17Arg	1	няма	няма	няма
	missense	NM_033360.2:c.34G>A	NP_203524.1:p.Gly12Ser	1	rs121913530	COSM1140136; COSM518	breast
SMAD4	missense	NM_005359.5:c.1082G>A	NP_005350.1:p.Arg361His	1	rs377767347	COSM14122	other
	missense	NM_005359.5:c.1528G>A	NP_005350.1:p.Gly510Arg	1	няма	COSM189742	other
AKT1	missense_splice	NM_001014431.1:c.49G>A	NP_001014431.1:p.Glu17Lys	1	rs121434592	COSM33765	breast
FGFR1	missense	NM_001174067.1:c.469T>C	NP_001167538.1:p.Ser157Pro	1	няма	няма	няма
PTPN11	missense	NM_002834.3:c.205G>A	NP_002825.3:p.Glu69Lys	1	rs397507511	COSM13013	other
RB1	missense	NM_000321.2:c.2163C>G	NP_000312.2:p.Phe721Leu	1	няма	няма	няма