

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ И  
МЕДИЦИНСКОЙ РАДИОЛОГИИ  
ИМ. Н.Н. АЛЕКСАНДРОВА»

УДК 618.19-006.6 + 616.419-006.6] : 575.191(043.3) (476)

**КАРПЕЙЧИК  
ЮЛИЯ ВИКТОРОВНА**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ОПУХОЛЕВЫХ  
КЛЕТОК В КОСТНОМ МОЗГЕ У ПАЦИЕНТОК С ОПЕРАБЕЛЬНЫМ  
РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

по специальности 14.01.12 – онкология

Минск, 2018

Научная работа выполнена в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

**Научный руководитель:** **Антоненкова Нина Николаевна**, доктор медицинских наук, доцент, главный научный сотрудник лаборатории реконструктивно-восстановительной хирургии и онкомамологии хирургического отдела государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

**Официальные оппоненты:** **Кужир Татьяна Дановна**, доктора биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярных основ стабильности генома государственного научного учреждения «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

**Шляхтунов Евгений Александрович**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры онкологии с курсами лучевой диагностики, лучевой терапии, ФПК и ПК, учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

**Оппонирующая организация:** Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Защита состоится «3» октября 2018 г. в 14 ч. на заседании совета по защите диссертаций Д 03.12.01 при государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» (223040, Минский р-н, агр. Лесной, E-mail: NArtemova@omr.med.by, тел. +375173899561).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова».

Автореферат разослан «4» июля 2018 г.

Ученый секретарь совета  
по защите диссертаций  
доктор медицинских наук, доцент

Н.А. Артемова

## ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) относится к числу социально значимых и распространенных заболеваний во всем мире у женщин. Рак сокращает среднюю продолжительность жизни женщин, наносит невосполнимый экономический ущерб обществу. Ранняя диагностика с помощью маммографического скрининга и проведение послеоперационной системной адъювантной терапии привели к снижению смертности от РМЖ в развитых странах. Тем не менее, смертность от РМЖ напрямую связана с ранним метастазированием и развитием рецидивов. Продолжительность жизни пациенток с метастатическим раком составляет 2-3 года [Rahman, M., 2015; Margan M. M. et al., 2016]. Диагностика гематогенного распространения эпителиальных опухолей на ранних стадиях — одна из главных проблем современной онкологии.

В последние годы особое внимание уделяется более точному стадированию заболевания, а также изучению таргетной терапии РМЖ. Доказано, что тактика лечения данной патологии, как и любого другого онкологического заболевания, определяется степенью распространенности опухолевого процесса. Стандартными клиническими показателями являются размер первичной опухоли, гистологическая степень злокачественности, наличие метастазов в лимфатических узлах, рецепторный статус опухоли и уровень амплификации гена эпидермального фактора роста II типа (Her-2/neu). Многоцентровые исследования показали, что у 25% радикально пролеченных пациенток в процессе наблюдения диагностируют развитие локальных рецидивов и метастазов опухоли. Однако до 30% пациенток с первоначальными метастазами в подмышечных лимфатических узлах наблюдаются без признаков рецидива заболевания в течение 5-10 лет [Кит О. И. и соавт., 2014].

Опухолевые клетки могут поступать в кровь и депонироваться в различных органах, в первую очередь, в костном мозге даже на самых ранних стадиях развития рака. Эти клетки называются циркулирующими опухолевыми клетками (ЦОК), если обнаруживаются в крови пациенток, или диссеминированными опухолевыми клетками (ДОК) при обнаружении в органах, в первую очередь, в костном мозге [Кит О. И. и соавт., 2014; Andergassen U. et al., 2013].

Костный мозг играет важную роль как индикатор минимальной остаточной болезни. Он рассматривается как резервуар ДОК, способных повторно поступать в отдаленные органы [Braun S. et al., 2003].

В последние годы доказано, что в процессе опухолевого роста нередко развиваются механизмы, обеспечивающие «ускользание» опухолевых клеток от надзора со стороны иммунной системы. Хотя антигены опухолевых клеток и распознаются иммунной системой, элиминация их происходит не всегда, так как механизмы, направленные на уничтожение опухолевых клеток, могут играть

противоположную роль, способствуя ее сохранению и прогрессии. Кроме того, опухоль по своему составу гетерогенна, что создает предпосылки для естественного отбора определенных клеточных клонов, наиболее приспособленных к окружающим условиям. Поиск механизмов, влияющих на диссеминацию опухолевых клеток в кровяном русле, важен как для снижения вероятности возможного прогрессирования, так и для определения новых прогностических факторов, а понимание процессов, вовлеченных в метастазирование, может привести к эффективным, целевым подходам в его лечении и профилактике [Бахтин А. В. и соавт., 2012]. Многие годы ДОК могут оставаться в «спящем» состоянии после полного удаления первичной опухоли [Uhr J. W., 2011].

Диагностика гематогенного распространения эпителиальных опухолей на ранней стадии — одна из главных проблем онкологии. Морфологически единичные разрозненные опухолевые клетки не определяются классическими методами диагностики, а необходимо применение высокочувствительных методов. К ним в настоящее время относятся иммуноцитологические (иммуноцитохимический, проточная цитометрия) и молекулярно-биологические (полимеразная цепная реакция) методы. В клинической практике не разработано высокочувствительных методов обнаружения микрометастазов. Методы исследования костного мозга нуждаются в дальнейшем развитии. В настоящее время накапливаются данные о том, что количественное определение и характеристика диссеминированных опухолевых клеток позволяют получить важную прогностическую информацию и проводить мониторинг эффективности терапии. Разработка и стандартизация методов выявления ДОК с высокой чувствительностью и специфичностью будут способствовать индивидуализации терапии онкологических пациентов [Аликс-Панабиер К., 2012; Тупицын Н. Н., 2013].

Вышеизложенное свидетельствует о том, что выделение новых молекулярно-биологических предсказательных критериев позволит не только правильно оценивать стадию заболевания, но и планировать выбор адекватной тактики лечения с применением наиболее эффективных лекарственных препаратов у пациенток, страдающих РМЖ, а, следовательно, является актуальным научным направлением.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Связь работы с научными программами (проектами) и темами**

Работа выполнена в рамках государственной научно-технической программы «Новые технологии диагностики и лечения» подпрограммы «Онкология», задание

03.24 «Разработать метод адьювантной химиотерапии больных операбельным раком молочной железы промежуточной и высокой групп риска с микрометастазами в костном мозге» (№ ГР 20091404, 2009-2013 гг.). Исследование соответствует плану научных работ государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова».

### **Цель и задачи исследования**

Цель исследования: повысить эффективность молекулярно-генетической диагностики резектабельного рака молочной железы на основе выявления диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге.

Задачи исследования:

1. Разработать метод молекулярно-генетической диагностики диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге.
2. Установить частоту выявления диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге пациенток, страдающих раком молочной железы, на основе экспрессии генов маммоглобина, цитокератина-19.
3. Оценить наличие опухолевых клеток в костном мозге в процессе лечения.
4. Исследовать взаимосвязь наличия опухолевых клеток, экспрессии гена *c-erbB-2* в костном мозге с клиническими, морфологическими и молекулярно-генетическими характеристиками первичной опухоли.

### **Научная новизна**

Обоснован, разработан и внедрен в клиническую практику метод диагностики диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге у пациенток, страдающих РМЖ, с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, позволяющий оценить пролиферативную активность клеток первичной опухоли к диссеминированию по уровням экспрессии генов СК-19 и МАМ с целью определения критерия отбора пациенток для назначения более интенсивного лечения. Применение разработанного метода позволило оценить состояние костного мозга у пациенток, страдающих РМЖ, и обнаружить опухолевые клетки в костном мозге в 26% случаев до начала проведения стандартной адьювантной полихимиотерапии.

Доказано преимущество использования рекомбинантной плазмиды, содержащей фрагменты генов СК-19, МАМ и АСТВ, в сравнительном аспекте с клеточной линией опухолевых клеток карциномы молочной железы, что позволило рассматривать плазмиду в качестве положительного контроля для калибровочных кривых при проведении молекулярно-генетического анализа.

Определены пороговые значения уровней экспрессии генов СК-19, МАМ и АСТВ, свидетельствующие о наличии диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге.

Показано, что наличие диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге не связано с клинико-морфологическими и молекулярно-генетическими характеристиками первичной опухоли.

Установлена статистически значимая взаимосвязь ( $p < 0,05$ ) между экспрессией гена *c-erbB-2* в костном мозге и экспрессией белка Her-2/neu в ткани первичной опухоли при резектабельном РМЖ, что позволяет уточнить степень агрессивности опухолевого процесса с целью индивидуализации лечения.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Разработанный метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени состоит в использовании самостоятельно подобранной последовательности нуклеотидов праймеров, реагентов и рассчитанных пороговых уровней по каждому исследуемому гену (СК-19 до 39 циклов и/или гена МАМ до 46 циклов), что позволяет определять наличие диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге у пациенток, страдающих раком молочной железы, с диагностической эффективностью 100%, аналитической чувствительностью от 3 до 5 копий кДНК генов СК-19 и МАМ на амплификационную пробирку.

2. Динамика содержания опухолевых клеток в процессе химиотерапии является дополнительным маркером оценки эффективности лечения. Частота обнаружения опухолевых клеток в костном мозге у 200 пациенток с резектабельным раком молочной железы составила 26% до начала проведения стандартной адъювантной полихимиотерапии и в 16% случаях после завершения стандартного лечения.

3. Обнаружение диссеминированных опухолевых клеток рака молочной железы в костном мозге не зависит от степени распространенности опухолевого процесса, состояния регионарного лимфатического аппарата, морфологической дифференцировки и гистологического типа опухоли, экспрессии рецепторов стероидных гормонов и эпидермального фактора роста опухоли Her-2/neu, категории риска возврата болезни ( $p > 0,05$ ).

4. У пациенток, страдающих раком молочной железы, амплификация гена *c-erbB-2* в костном мозге сопряжена с экспрессией белка Her-2/neu в тканях первичной опухоли ( $p < 0,05$ ). Сравнительная индивидуальная оценка экспрессии гена *c-erbB-2* в образцах костного мозга даёт дополнительную информацию для выявления потенциально более агрессивных злокачественных опухолей.

### **Личный вклад соискателя ученой степени**

Все основные научные результаты диссертационной работы получены автором лично. Изучена отечественная и зарубежная литература по теме диссертационной работы, обоснована актуальность исследования. Автором обработана медицинская документация и создана компьютерная база данных пациенток, страдающих РМЖ. Выполнены молекулярно-генетические исследования по определению экспрессии генов MAM, СК-19 и c-erbB-2 в костном мозге у пациенток, включенных в исследование. Соискателем лично осуществлена интерпретация полученных результатов, сформулированы выводы, научные положения и практические рекомендации.

Соискателем совместно с соавторами разработано и внедрено в практику Республиканской молекулярно-генетической лаборатории канцерогенеза РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова рационализаторское предложение «Способ определения эффективности лечения больной операбельным раком молочной железы» (№ 144, 19 января 2012 г.).

Автор диссертации участвовал в разработке патента: «Способ диагностики микрометастазов в костном мозге при резектабельном раке молочной железы» № 20581, заявка № а20130740 (2013.06.11), зарегистрирован в Госреестре 9. 07. 2016 г.

Министерством здравоохранения Республики Беларусь утверждена инструкция по применению: «Метод определения экспрессии генов СК-19 и MAM в костном мозге при раке молочной железы I-III стадии» (№ 083-1017, 1. 11. 2017 г.).

Полученные результаты внедрены для практического применения в Республиканской молекулярно-генетической лаборатории канцерогенеза РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова.

### **Апробация диссертации и информации об использовании ее результатов**

Основные результаты исследования доложены и обсуждены на съездах и конференциях: на Республиканской научно-практической конференции «Современные молекулярно-генетические методы диагностики в медицине» (Гомель, 22 октября 2010 г.); на Международной научной конференции молодых ученых, аспирантов, магистрантов, студентов «Экология человека и проблемы окружающей среды в постчернобыльский период» (Минск, 11–12 ноября 2010 г.); на Международной научной конференции «Сахаровские чтения 2011 года: экологические проблемы XXI века» (Минск, 19–20 мая 2011 г.); на научных сессиях УО «Белорусский государственный медицинский университет» (Минск,

27 января 2011, 26 января 2016 г.); на IX съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Минск, 15–17 июня 2016 г.).

### **Опубликованность результатов диссертации**

По теме диссертации опубликовано 18 научных работ: 3 статьи в научных журналах, включенных в перечень научных изданий ВАК Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований; 13 работ в материалах конференций и съездов; инструкция по применению, утвержденная Министерством здравоохранения Республики Беларусь; патент Республики Беларусь. Без соавторов опубликованы 2 научные статьи. Объем опубликованных статей составил 1,5 авторских листа.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, четырех глав, заключения и библиографического списка, включающего 181 литературный источник (28 — на русском языке, 153 — на иностранных языках), 18 собственных публикаций, 4 приложения. Работа изложена на 91 странице (без учета библиографического списка и приложений), содержит 34 таблицы и 5 формул (уравнений), иллюстрирована 30 рисунками.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материал и методы клинического исследования**

Материалом для исследования послужил костный мозг 200 пациенток, страдающих РМЖ в возрасте  $52,8 \pm 0,7$  лет. Все пациентки обследованы и получили лечение в РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова с 2009 по 2013 гг. Пациентки включались в исследование после клиничко-лабораторного, рентгенологического обследования с обязательным морфологическим подтверждением диагноза, а также после проведения радикального хирургического лечения.

В рамках изучения клиничко-биологических прогностических факторов в опухолевой ткани у пациенток, страдающих РМЖ, с помощью иммуногистохимического метода изучена экспрессия рецептора эпидермального фактора роста (Her-2/neu), показателей эндокринной чувствительности (экспрессия стероидных гормонов — рецепторов эстрогенов и прогестерона).

Характеристика пациенток, клинические и патоморфологические параметры опухолей представлены в таблице 1.



Таблица 1. – Характеристика пациенток, клинические и патоморфологические параметры опухолей

Критерий	Распределение пациенток		
	подгруппы	абсолютное число наблюдений (n)	относительное число наблюдений (%)
Стадия	I	26	13,0±2,4
	II	88	44,0±3,5
	III	86	43,0±3,5
Размер опухоли	T1	62	31,0±3,3
	T2	97	48,5±3,5
	T3	10	5,0±1,5
	T4	31	15,5±2,6
Поражение лимфатических узлов	N0	61	30,5±3,3
	N1	67	33,5±3,3
	N2	30	15,0±2,5
	N3	42	21,0±2,9
Степень дифференцировки	G1	9	4,5±1,5
	G2	136	68,0±3,3
	G3	54	27,0±3,1
	G4	1	0,5±0,49
Гистологический вариант опухоли	инфильтрирующая дольковая карцинома	34	17,0±2,7
	инфильтрирующая протоковая карцинома	141	70,5±3,2
	другие виды	25	12,5±2,3
Гормонально-рецепторный статус ER	ER-	67	33,5±3,3
	ER+	133	66,5±3,4
Гормонально-рецепторный статус PR	PR-	83	41,5±3,5
	PR+	117	58,5±3,5
Экспрессия Her-2/neu	Отрицательная	130	65,0±3,4
	Положительная	70	35,0±3,4

Всем пациенткам до начала полихимиотерапии проводилось молекулярно-генетическое исследование биоптатов костного мозга. Материал для исследования получали с помощью стерильной пункции. Объем костномозгового пунктата составлял 4 мл. Образцы костного мозга забирались в пробирки с этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА). Выделение опухолевых клеток из костного мозга проводилось в градиенте плотности фикола Histopaque 1077 (Sigma, США).

Выделение мРНК из опухолевых клеток костного мозга осуществлялось с использованием набора для выделения РНК по протоколу производителя. С

помощью реакции обратной транскрипции полученная мРНК переводилась в комплементарную ДНК (кДНК). Далее кДНК использовалась для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

Для выявления диссеминированных опухолевых клеток применялось определение экспрессии генов цитokerатина-19 (СК-19) и маммоглобина (МAM) в костном мозге методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме «реального времени».

Статистический анализ полученных результатов выполнялся с использованием программного обеспечения STATISTICA 8.0 «StatSoft», США. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для оценки достоверности различий между независимыми количественными выборками применяли непараметрический критерий Краскела–Уоллиса. В случае обнаружения статистических различий между группами проводили попарный анализ с использованием критерия Манна–Уитни. Оценка зависимости между количественными переменными проводилась по коэффициенту корреляции Спирмена. Достоверными считались различия с вероятностью не менее 95% ( $p < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Разработка молекулярно-генетического метода для определения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге**

*Подбор олигонуклеотидных праймеров и зондов для проведения ПЦР в режиме реального времени с реакцией обратной транскрипции.* На первом этапе работы были подобраны олигонуклеотидные зонды и праймеры для специфического выявления матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) генов СК-19, МAM и гена «домашнего хозяйства» АСТВ человека из базы данных GenBank, NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Дизайн олигонуклеотидных зондов проводили в программе OligoWiz 2.1. Выбранные олигонуклеотидные зонды дополнительно анализировали в программах BLAST для выявления спектра возможной неспецифической гибридизации и MFold на предмет наличия вторичных структур типа «шпильки» (таблица 2).

Таблица 2. – Олигонуклеотидные зонды и праймеры для генов СК-19, МАМ, АСТВ

Ген	Характеристики		
	номер в базе данных NCBI	последовательность олигонуклеотидного зонда, 5'-3'	последовательности праймеров, 5'-3'
СК-19	NM_002276	CCATTGAGAACTCCA GGATTGTCCTGCA	CCCGCGACTACAGCCACTA
			CTCATGCGCAGAGCCTGTT
МАМ	NM_002411	CGGCCCTCTCCCAGCA CTGC	ATGAAGTTGCTGATGGTCC TCAT
			GTCTTAGACACTTGTGGAT TGATTGTCT
АСТВ	NM_001101	CTGCCTTACAGATCAT GTTT	GGCCGCGGTGTACGCCAAC ACAGTGCTC
			CCCGGGCCCGTCATACTCC TGCTTGCTG

**Оптимизация условий ОТ-ПЦР в режиме реального времени для определения экспрессии генов МАМ и СК-19.** В процессе разработки метода были оптимизированы условия проведения ОТ-ПЦР в режиме реального времени: по концентрации кДНК, MgCl<sub>2</sub>, праймеров и зонда в реакционной смеси и температуре отжига. Были установлены оптимальная температура отжига — 60°C и концентрация MgCl<sub>2</sub> в реакционной смеси — 2,5 мМ, использованные в дальнейшей работе. Концентрация рибонуклеиновой кислоты для постановки реакции обратной транскрипции путем многократных разведений и постановок была подобрана как 1 мкг на 30 мкл смеси для обратной транскрипции.

В качестве рабочей концентрации праймеров была выбрана концентрация 0,3 мкМ для гена СК-19, 0,9 мкМ для МАМ каждого праймера на 30 мкл реакционной смеси для этапа ОТ-ПЦР в режиме реального времени. В качестве рабочей концентрации зондов была выбрана концентрация для зонда СК-19 — 0,15 мкМ, для МАМ — 0,2 мкМ.

**Использование клеточной линии и плазмиды для изучения экспрессии генов СК-19, МАМ и c-erbB-2 в костном мозге у пациенток, страдающих РМЖ.** Для изучения экспрессии генов СК-19 и МАМ в костном мозге у пациенток, страдающих РМЖ, была выбрана клеточная линия опухолевых клеток карциномы молочной железы ZR-75-1 (коллекция клеточных культур Института цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург).

Подсчет количества клеток в 1 мл жидкости производили с помощью микроскопа в счетной камере Горяева. Для выделения мРНК использовали приблизительно  $1 \times 10^6$  клеток. Выделение мРНК проводили с использованием набора RNAqueous-4PCR Kit (Ambion, США). Концентрацию мРНК измеряли на

спектрофотометре. Анализ чистоты выделенной мРНК проводили по показателю соотношения интенсивностей пиков A260/A280. Для очищенной мРНК это соотношение составляло 1,8–2,1 относительных единиц.

Общая мРНК из клеточной линии ZR-75-1 была использована в качестве положительного контроля для обнаружения раковых клеток в костном мозге у пациенток РМЖ, а также определения чувствительности разработанного метода.

В связи с низкой жизнеспособностью и сложностью культивирования данной клеточной линии в последующей работе был сконструирован генно-инженерный «положительный» контроль — искусственный вектор (плазмида), с клонированными участками генов, имеющих места посадки специфических праймеров.

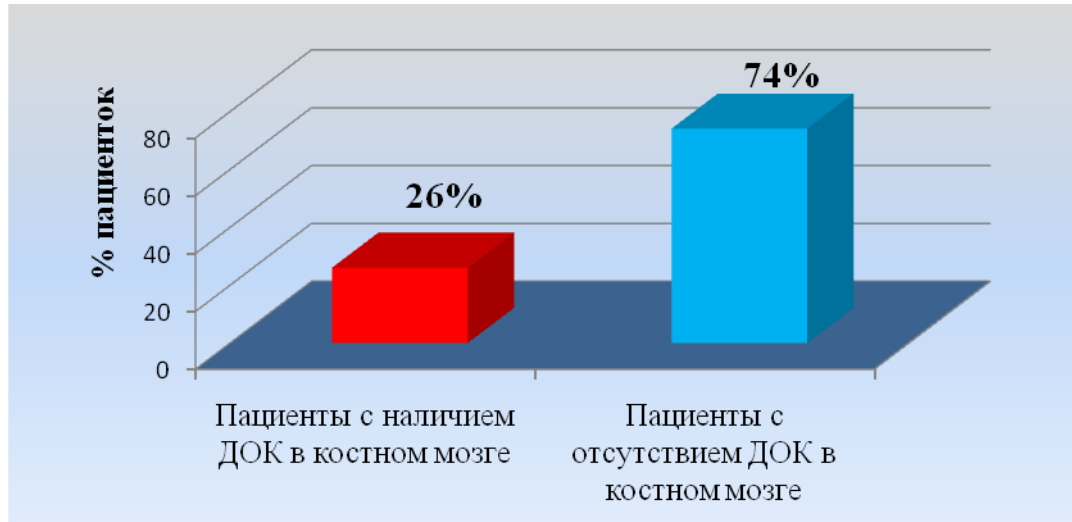
Образцы крови добровольцев служили отрицательным контролем. В группу вошло 20 здоровых добровольцев, во вторую — 20 пациенток с доброкачественными новообразованиями молочной железы, костный мозг 7 лиц, не имеющих опухолей молочной железы и других опухолей эпителиального происхождения, выступал так же в качестве отрицательного контроля.

**Диагностические характеристики разработанного метода.** В результате проведенного молекулярно-генетического исследования разработан метод определения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге у пациенток, страдающих РМЖ.

Наличие диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге определялось с помощью ПЦР в режиме реального времени при уровне экспрессии СК-19 до 39 циклов и/или МАМ до 46 циклов. Для референсного гена  $\beta$ -актина рассчитан 95% доверительный интервал и среднее значение  $18,15 \pm 0,95$  циклов. Предложенный метод при анализе серийных разведений линии опухолевых клеток ZR-75-1 и плазмид, содержащих целевые гены СК-19, МАМ,  $\beta$ -актина, показал высокую чувствительность, линейность и эффективность ОТ-ПЦР в режиме реального времени в выбранных условиях и с подобранными праймерами. Аналитическая специфичность метода составила 100%, аналитическая чувствительность — от 3 до 5 копий кДНК генов СК-19 и МАМ на амплификационную пробирку. Воспроизводимость результатов при количественной детекции кДНК генов СК-19 и МАМ составила не менее 97%.

**Оценка взаимосвязи между наличием диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге и морфологическими, прогностическими характеристиками рака молочной железы**

Результаты проведенного исследования с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени показали, что до начала лекарственного лечения частота поражения костного мозга эпителиальными опухолевыми клетками у пациенток, страдающих РМЖ, составила 26% (рисунок 1).



**Рисунок 1. – Частота выявления опухолевых клеток в костном мозге у пациенток с РМЖ**

Для оценки клинического значения разработанного диагностического метода проведен анализ связи результатов молекулярно-генетического анализа по выявлению диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге с другими показателями, характеризующими РМЖ по системе TNM, стадии, возрасту, гистологической степени злокачественности, статусам рецепторов стероидных гормонов и рецепторов эпидермального фактора роста 2 типа.

Не установлено статистически значимого различия ( $p > 0,05$ ) в группах пациенток с диссеминированными опухолевыми клетками и без опухолевых клеток в костном мозге по клинико-морфологическим характеристикам опухоли: по степени распространенности опухолевого процесса ( $p = 0,28$ ), количеству метастатических регионарных лимфатических узлов ( $p = 0,75$ ), степени дифференцировки опухоли ( $p = 0,71$ ), стадии заболевания ( $p = 0,88$ ), уровням экспрессии рецепторов: ER ( $p = 0,44$ ), PR ( $p = 0,57$ ), эпидермального фактора роста второго типа ( $p = 0,78$ ), гистологическому типу опухоли ( $p = 0,31$ ), категории риска возврата болезни ( $p = 0,57$ ).

#### **Динамика наличия диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге у пациенток, страдающих раком молочной железы, в процессе лечения**

Исследование костного мозга в динамике после проведения стандартного курса полихимиотерапии (доксорубин, циклофосфамид) было проведено 200 пациенткам, страдающим РМЖ. Частота выявления диссеминированных опухолевых клеток в процессе лечения составила  $16 \pm 2,6\%$ . Из полученных данных следует, что количество пациенток с наличием опухолевых клеток снижается после проведенной химиотерапии.

При изучении результатов исследования костного мозга в группе пациенток с диссеминированными опухолевыми клетками (52 пациентки) было отмечено, что у 23 (11,5±2,3%) пациенток сохраняется наличие опухолевых клеток после проведения системного противоопухолевого лечения. Согласно результатам исследования, у 29 (14,5±2,5%) пациенток с поражением костного мозга после проведенного лечения результат ПЦР исследования был отрицательный, что может говорить о положительном эффекте терапии.

В группе пациенток без диссеминированных опухолевых клеток (148 пациенток) до начала 4 курсов лекарственной терапии после первого проведенного исследования, второе исследование после 4 курсов показало наличие опухолевых клеток в костном мозге у 9 (4,5±1,5%) пациенток.

### **Оценка экспрессии гена c-erbB-2 в костном мозге у пациенток, страдающих раком молочной железы**

Анализ молекулярно-генетических исследований показал, что экспрессия гена c-erbB-2 выявлена в костном мозге у 196 (98,5%) из 200 пациенток, страдающих РМЖ. Экспрессия гена c-erbB-2 в костном мозге варьировала в пределах 0,00002 до 1,9 отн. ед. У 78,5% (157) пациенток уровень экспрессии составлял от 0 до 0,1 отн. ед, у 19,5% (39) пациенток — от 0,1 до 1,0 отн. ед., у 4 пациенток уровень экспрессии был выше 1,0 отн. ед.

В рамках выполненного исследования проведен сравнительный анализ между уровнями экспрессии гена c-erbB-2 в костном мозге, полученными по результатам тестирования методом ПЦР в режиме реального времени, клиническими и морфологическими характеристиками первичной опухоли.

В исследовании не установлено статистически значимой связи между уровнем экспрессии гена c-erbB-2 в костном мозге и возрастом пациенток ( $p=0,63$ ), стадией заболевания ( $p=0,27$ ), степенью поражения регионарных лимфатических узлов ( $p=0,91$ ), гистологической формой опухоли ( $p=0,76$ ), степенью ее дифференцировки ( $p=0,89$ ), а также статусом ER ( $p=0,26$ ) и PR ( $p=0,63$ ).

Исследование показало наличие статистически значимой связи ( $p<0,05$ ) между уровнем экспрессии гена c-erbB-2 в костном мозге и уровнем экспрессии онкопротеина HER-2/neu в ткани первичной опухоли пациенток, страдающих РМЖ. В 19,2% случаев у пациенток с ДОК в костном мозге определялась гиперэкспрессия гена c-erbB-2.

Определение экспрессии данного гена в костном мозге может использоваться в качестве дополнительного критерия оценки степени пролиферативной активности и агрессивности первичной опухоли молочной железы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. Разработан молекулярно-генетический метод, позволяющий определять наличие диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге у пациенток, страдающих раком молочной железы, основанный на выявлении уровня экспрессии генов СК-19, МАМ, определяемых полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией в режиме реального времени (аналитическая специфичность метода составила 100%, аналитическая чувствительность составила от 3 до 5 копий кДНК генов СК-19 и МАМ на амплификационную пробирку, воспроизводимость результатов 97%). Дизайн метода: забор костного мозга у пациенток до проведения адъювантной терапии, выделение тотальной РНК, проведение обратной транскрипции, амплификация полученных кДНК, оценка экспрессии генов СК-19 и МАМ в образце [2, 8, 10, 12, 14, 15, 17, 18].

2. Наличие диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге определяется при уровне экспрессии СК-19 до 39 циклов и/или МАМ до 46 циклов. Для референсного гена АСТВ при 95% доверительном интервале среднее значение составило  $18,15 \pm 0,95$  циклов. Использование рекомбинантной плазмиды, содержащей фрагмент генов МАМ, СК-19 и АСТВ, более эффективно при проведении анализа, по сравнению с клеточной линией опухолевых клеток карциномы молочной железы ZR-75-1, что позволяет рассматривать плазмиду в качестве положительного контроля для калибровочных кривых [2, 12, 14, 15, 17, 18].

3. Применение разработанного метода для оценки состояния костного мозга при резектабельном РМЖ с категорией M0 (200 пациенток) позволило обнаружить опухолевые клетки в костном мозге у 26% пациенток до начала проведения стандартной адъювантной полихимиотерапии, у 11,5% — после завершения стандартной адъювантной полихимиотерапии с пораженным костным мозгом и у 4,5% пациенток опухолевые клетки выявляются с изначально непораженным костным мозгом, что свидетельствует о необходимости персонализации тактики лечения и наблюдения за данным контингентом пациенток [1, 4, 6, 9].

4. Наличие диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге не связано с клинико-морфологическими характеристиками первичной опухоли: не установлено статистически значимого различия ( $p > 0,05$ ) в группах пациенток с опухолевыми клетками и без опухолевых клеток в костном мозге: по степени распространенности опухолевого процесса ( $p = 0,28$ ), количеству метастатических регионарных лимфатических узлов ( $p = 0,54$ ), степени дифференцировки опухоли

( $p=0,71$ ), стадии заболевания ( $p=0,88$ ), уровням экспрессии рецепторов: ER ( $p=0,44$ ), PR ( $p=0,57$ ), Her-2/neu ( $p=0,78$ ), гистологическому типу опухоли ( $p=0,31$ ), категории риска возврата болезни ( $p=0,57$ ) [1, 4, 9, 11, 16].

5. Установлена статистически значимая взаимосвязь ( $p<0,05$ ) между уровнем экспрессии гена c-erbB-2 в костном мозге и экспрессией белка Her-2/neu в тканях первичной опухоли при резектабельном РМЖ с диссеминированными опухолевыми клетками в костном мозге. В 19,2% случаев у пациенток с диссеминированными опухолевыми клетками в костном мозге определяется гиперэкспрессия гена c-erbB-2. Определение экспрессии данного гена в костном мозге может использоваться в качестве дополнительного критерия оценки степени агрессивности первичной опухоли молочной железы и дополнительного критерия отбора пациенток для назначения оптимальной терапии [3, 5, 6, 7, 13].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

Обнаружение опухолевых клеток в костном мозге с помощью разработанного молекулярно-генетического метода указывает на повышенную способность клеток первичной опухоли к диссеминированию, риску раннего метастазирования и может быть критерием отбора пациенток для назначения оптимальной терапии.

Разработанный метод определения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге при резектабельном раке молочной железы позволяет проводить дифференцированный подход к назначению лечения и ранней оценке его эффективности. Рекомендуется динамическое исследование костного мозга в процессе лечения.

Применение метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени для выявления диссеминированных опухолевых клеток может быть рекомендовано к практическому применению в клинической практике учреждений здравоохранения онкологического профиля, специализирующихся на лечении рака молочной железы и имеющих возможность проведения молекулярно-генетических исследований (ОТ-ПЦР) [17,18].



## Список публикаций соискателя ученой степени

### Статьи в изданиях, включенных в перечень ВАК

1. Антоненкова, Н. Н. Диссеминированные опухолевые клетки в костном мозге при раке молочной железы / Н. Н. Антоненкова, Р. М. Смолякова, Ю. В. Карпейчик // Онколог. журн. – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 46–52.
2. Карпейчик, Ю. В. Разработка метода диагностики диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге при раке молочной железы / Ю. В. Карпейчик // Онколог. журн. – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 63–67.
3. Карпейчик, Ю. В. Молекулярно-генетическая диагностика уровня экспрессии гена *c-erbB-2* в костном мозге при раке молочной железы / Ю. В. Карпейчик // Экол. вестн. – 2016. – № 3. – С. 85–90.

### Материалы конференций и тезисы докладов

4. Молекулярно-биологические факторы прогноза у больных раком молочной железы / М. П. Будько, Е. А. Мохонь, Е. И. Субоч, Ю. В. Короляш, Е. А. Леусик // Сахаровские чтения 2008 года: экологические проблемы XXI века : материалы 8-й междунар. науч. конф., Минск, 22–23 мая 2008 г. / Междунар. гос. экол. ун-т. им. А. Д. Сахарова ; под ред. С. П. Кундаса, С. Б. Мельнова, С. С. Позняка. – Минск : МГЭУ им. А. Д. Сахарова, 2008. – С. 45.
5. Короляш, Ю. В. Экспрессия гена *c-erbB-2* в костном мозге операбельных больных раком молочной железы / Ю. В. Короляш, М. Н. Клименков, И. А. Картузова // Сахаровские чтения 2010 года: экологические проблемы XXI века : материалы 10-й междунар. науч. конф., Минск, 20–21 мая 2010 г. / Междунар. гос. экол. ун-т. им. А. Д. Сахарова ; под ред. С. П. Кундаса, С. Б. Мельнова, С. С. Позняка. – Минск : МГЭУ им. А. Д. Сахарова, 2010. – Ч. 1. – С. 117–118.
6. Короляш, Ю. В. Субклиническое метастазирование у операбельных больных раком молочной железы промежуточной и высокой групп риска: диагностическое и прогностическое значение цитокератина 19, маммоглобина и *c-erbB-2* / Ю. В. Короляш, И. В. Смолякова, Р. М. Смолякова // Экология человека и проблемы окружающей среды в постчернобыльский период : материалы междунар. науч. конф. молодых ученых, аспирантов, магистрантов, студентов, Минск, 11–12 нояб. 2010 г. / Междунар. гос. экол. ун-т. им. А. Д. Сахарова ; под общ. ред. С. Б. Мельнова, С. С. Позняка. – Минск, 2011. – С. 27–28.
7. Диагностическое и прогностическое значение экспрессии цитокератина 19, маммоглобина и *c-erbB-2* у операбельных больных раком молочной железы промежуточной и высокой групп риска / Ю. В. Короляш, Э. А. Жаврид,

Р. М. Смолякова, Н. Н. Антоненкова, Е. В. Баранов // XVIII рос. нац. конгресс «Человек и лекарство» : сб. материалов конгресса, Москва, 11–15 апр. 2011 г. / Минздравсоцразвития РФ [и др.] ; под ред. А. Г. Чучалина. – М., 2011. – С. 72–73.

8. Молекулярно-генетическая диагностика диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге у операбельных больных раком молочной железы / Ю. В. Короляш, И. В. Смолякова, М. А. Воравко, Р. М. Смолякова // Сахаровские чтения 2011 года: экологические проблемы XXI века : материалы 11-й междунар. науч. конф., Минск, 19-20 мая 2011 г. / Междунар. гос. экол. ун-т. им. А. Д. Сахарова ; под ред. С. П. Кундаса, С. С. Позняка. – Минск : МГЭУ им. А. Д. Сахарова, 2011. – С. 81.

9. Молекулярно-генетическая характеристика диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге у операбельных больных раком молочной железы в процессе комбинированного лечения / Ю. В. Короляш, Р. М. Смолякова, Э. А. Жаврид, Н. Н. Антоненкова, Е. В. Баранов // Инновации в онкологической практике: 65 лет онкологической службе Алтайского края : материалы Рос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Барнаул, 14–15 июня 2011 г. / Рос. Акад. мед. наук [и др.] ; под ред. А. Ф. Лазарева. – Барнаул, 2011. – С. 124–125.

10. Молекулярно-генетическая диагностика диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге у операбельных больных раком молочной железы в процессе комбинированного лечения / Ю. В. Короляш, Р. М. Смолякова, Э. А. Жаврид, С. П. Козловская, Е. В. Баранов, Нина. Н. Антоненкова, И. В. Стукалова // Материалы IV съезда онкологов Респ. Беларусь, Минск, 3–5 нояб. 2011 г. – [Опубл. в журн.] Онколог. журн. – 2011. – Т. 5, № 3. – С. 76–77.

11. Факторы прогноза при резектабельном раке молочной железы с микрометастазами в костном мозге / Э. А. Жаврид, Н. Н. Антоненкова, Р. М. Смолякова, С. П. Козловская, Ю. В. Карпейчик // Актуальные вопросы диагностики и лечения онкологических заболеваний : материалы респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Минск, 20 дек. 2013 г. – [Опубл. в журн.] Онколог. журн. – 2013. – Т. 7, № 4, прил. – С. 21–22.

12. Карпейчик, Ю. В. Разработка теста для диагностики единичных опухолевых клеток в костном мозге при раке молочной железы / Ю. В. Карпейчик, С. П. Козловская // Санкт-Петербургские научные чтения – 2015 : тез. VI междунар. молодежного мед. конгр., Санкт-Петербург, 2–4 дек. 2015 г. / Первый С.-Петерб. гос. мед. ун-т. им. академика И. П. Павлова, Ком. по науке и высшей школе Санкт-Петербурга ; редкол.: Е. И. Баранова [и др.]. – СПб., 2015. – С. 198–199.

13. Карпейчик, Ю. В. Прогностическое значение c-erbB-2-положительных диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге у пациенток, страдающих раком молочной железы / Ю. В. Карпейчик, С. П. Козловская // «Студенческая наука и здоровье» : сб. тез. 58-ой междунар. науч.-практ. студ.

конф., посвящ. 80-летию доц. Шаймарданова К. А. и проф. Савицкой Л. Н., Семей, 20–21 апр. 2016 г. / Гос. мед. ун-т. г. Семей ; редкол.: Т. К. Рахыпбеков [и др.]. – Семей, 2016. – С. 184–185.

14. Карпейчик, Ю. В. Определение опухолевых клеток в костном мозге у пациенток, страдающих раком молочной железы / Ю. В. Карпейчик // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2016 : сб. тез. LXXVII науч.-практ. конф., Санкт–Петербург, 27 апр. 2016 г. / Первый С.-Петерб. гос. мед. ун-т. им. И. П. Павлова ; редкол.: Н. А. Гавришева [и др.]. – СПб., 2016 г. – С. 116.

15. Разработка тест-системы для определения уровня экспрессии генов СК-19, МАМ в костном мозге у пациенток, страдающих раком молочной железы / Ю. В. Карпейчик, Р. М. Смолякова, Э. А. Жаврид, Н. Н. Антоненкова, С. П. Козловская // Материалы IX съезда онкологов и радиологов СНГ и Евразии, Минск, 15–17 июня. 2016 г. – [Опубл. в журн.] Евраз. онкол. журн. – 2016. – Т. 4, № 2. – С. 287–288.

16. Диссеминированные опухолевые клетки в костном мозге при раке молочной железы / Ю. В. Карпейчик, Р. М. Смолякова, Э. А. Жаврид, Н. Н. Антоненкова, С. П. Козловская // Материалы IX съезда онкологов и радиологов СНГ и Евразии, Минск, 15–17 июня 2016 г. – [Опубл. в журн.] Евраз. онкол. журн. – 2016. – Т. 4, № 2. – С. 288.

### **Инструкция по применению**

17. Метод определения экспрессии генов СК-19 и МАМ в костном мозге при раке молочной железы I–III стадий : инструкция по применению № 083-1017 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 01.11.2017 / РНПЦ ОМР им Н. Н. Александрова; сост. Н. Н. Антоненкова, Ю. В. Карпейчик, Э. А. Жаврид, А. Ч. Дубровский, С. П. Козловская. – Минск, 2017. – 8 с.

### **Патент**

18. Способ диагностики наличия микрометастазов в костном мозге при резектабельном раке молочной железы : пат. ВУ 20581 / Ю. В. Карпейчик, Э. А. Жаврид, Р. М. Смолякова, Н. Н. Антоненкова, С. П. Козловская. – Опубл. 09.08.2016.

**РЭЗІЮМЭ****Карпейчык Юлія Віктараўна****Малекулярна-генетычная дыягностыка пухлінавых клетак у касцяным мозгу ў пацыентак з аперабельным ракам малочнай залозы**

**Ключавыя словы:** рак малочнай залозы (РМЗ), ген СК-19, ген МАМ, ген *c-erbB-2*, палімеразная ланцуговая рэакцыя (ПЛР), дысемінаваныя пухлінавыя клеткі.

**Мэта даследавання:** павялічыць эфектыўнасць малекулярна-генетычнай дыягностыкі агрэсіўных формаў рэзектабельнага РМЗ на аснове выяўлення дысемінаваных пухлінавых клетак у касцявым мозгу.

**Метады даследавання:** малекулярна-генетычныя (выдзяленне татальнай РНК, палімеразная ланцуговая рэакцыя «у рэжыме рэальнага часу»), імунагістахімічныя, статыстычныя.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна.** Распрацаваны высокаэфектыўны малекулярна-генетычны метады, што дазваляе вызначаць наяўнасць дысемінаваных пухлінавых клетак у касцявым мозгу па ўзроўні экспрэсіі генаў СК-19, МАМ пры рэзектабельным РМЗ, заснаваны на выкарыстанні ПЛР у рэжыме рэальнага часу. Упершыню вызначаны парогавыя значэнні ўзроўняў экспрэсіі генаў СК-19, МАМ і АСТВ, што сведчаць пра наяўнасць дысемінаваных пухлінавых клетак у касцявым мозгу. Даказана, што наяўнасць дысемінаваных пухлінавых клетак у касцявым мозгу не звязана з клінічна-марфалагічнымі характарыстыкамі першаснай пухліны ( $p > 0,05$ ). Усталявана статыстычна значная ўзаемасувязь ( $p < 0,05$ ) паміж узроўнем экспрэсіі гена *c-erbB-2* у касцявым мозгу і экспрэсіяй бялку Her-2/neu у тканінах першаснай пухліне пры РМЗ з дысемінаванымі пухлінавымі клеткамі ў касцявым мозгу. Распрацаваны метады выяўлення дысемінаваных пухлінавых клетак у касцявым мозгу пры рэзектабельным раку малочнай залозы дазваляе праводзіць дыферэнцыяваны падыход да прызначэння лячэння і ранняй ацэнкі яго эфектыўнасці.

**Ступень выкарыстання:** матэрыялы дысертацыйнай працы выкарыстоўваюцца ў РНПЦ АМР ім. М.М. Аляксандрава.

**Вобласць ужывання:** анкалогія, лабараторная дыягностыка.

## РЕЗЮМЕ

**Карпейчик Юлия Викторовна**

### **Молекулярно-генетическая диагностика опухолевых клеток в костном мозге у пациенток с операбельным раком молочной железы**

**Ключевые слова:** рак молочной железы (РМЖ), ген СК-19, ген МАМ, ген *c-erbB-2*, полимеразная цепная реакция (ПЦР), диссеминированные опухолевые клетки.

**Цель исследования:** повысить эффективность молекулярно-генетической диагностики агрессивных форм резектабельного РМЖ на основе выявления диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге.

**Методы исследования:** молекулярно-генетические (выделение тотальной РНК, полимеразная цепная реакция «в режиме реального времени»), иммуногистохимические, статистические.

**Полученные результаты и их новизна.** Разработан высокоэффективный молекулярно-генетический метод, позволяющий определять наличие диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге по уровню экспрессии генов СК-19, МАМ при резектабельном РМЖ, основанный на применении ПЦР в режиме реального времени. Впервые определены пороговые значения уровней экспрессии генов СК-19, МАМ и АСТВ, свидетельствующие о наличии диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге. Доказано, что наличие диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге не связано с клиническо-морфологическими характеристиками первичной опухоли ( $p > 0,05$ ). Установлена статистически значимая взаимосвязь ( $p < 0,05$ ) между уровнем экспрессии гена *c-erbB-2* в костном мозге и экспрессией белка Her-2/neu в тканях первичной опухоли при РМЖ с диссеминированными опухолевыми клетками в костном мозге. Разработанный метод определения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге при резектабельном раке молочной железы позволяет проводить дифференцированный подход к назначению лечения и ранней оценке его эффективности.

**Степень использования:** материалы диссертационной работы используются в РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова.

**Область применения:** онкология, лабораторная диагностика.

## SUMMARY

**Karpeychik Yulia Victorovna**

### **Molecular genetic diagnosis of tumor cells in the bone marrow patients with operable breast cancer**

**Key words:** breast cancer, gene CK-19, gene MAM, gene c-erbB-2, polymerase chain reaction (PCR), disseminated tumor cells.

**Objective of the research:** to improve the effectiveness of molecular genetic diagnosis of aggressive forms of resectable breast cancer on the basis of detection of disseminated tumor cells in the bone marrow.

**Methods:** genetic (isolation of total RNA, polymerase chain reaction "in real team"), immunohistochemical, statistical.

**Results and their novelty.** A highly effective molecular genetic method has been developed that makes it possible to determine the presence of disseminated tumor cells in the bone marrow according to the expression level of the CK-19, MAM genes in resectable breast cancer, based on real-time PCR. The threshold values for the expression levels of the CK-19, MAM and ACTB genes have been determined for the first time, indicating the presence of disseminated tumor cells in the bone marrow. It has been proved that the presence of disseminated tumor cells in the bone marrow is not associated with the clinical and morphological characteristics of the primary tumor ( $p > 0.05$ ). A statistically significant relationship ( $p < 0.05$ ) between the expression level of the c-erbB-2 gene in the bone marrow and the expression of the Her-2/neu protein in the primary tumor tissue in breast cancer with disseminated tumor cells in the bone marrow has been established. The developed method for determining disseminated tumor cells in the bone marrow with resectable breast cancer allows for a differentiated approach to treatment and early evaluation of its effectiveness.

**Usage:** the materials of the dissertation are being used in N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus.

**Field of application:** oncology, laboratory diagnostics.

КАРПЕЙЧИК ЮЛИЯ ВИКТОРОВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ОПУХОЛЕВЫХ  
КЛЕТОК В КОСТНОМ МОЗГЕ У ПАЦИЕНТОК С ОПЕРАБЕЛЬНЫМ  
РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук  
по специальности 14.01.12 – онкология

Ответственный за выпуск Ю.В. Карпейчик

Подписано в печать 19.06.2018г. Формат 60x80 1/16.  
Бумага офсетная. Печать цифровая.  
Усл. печ. 1,6 л. Уч.-изд. 1,41 л. Тираж 60 экз. Заказ 114.

Отпечатано в типографии РУП «НПЦ НАН Беларуси  
по механизации сельского хозяйства»  
220049, г. Минск, ул. Кнорина, 1, корп. 3.  
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 1/341 от 02.06.2014г.