

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**  
**БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**  
**Кафедра молекулярной биологии**

Аннотация к дипломной работе

**КУШНЕРОВА**  
Елизавета Викторовна

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА МОНИТОРИНГА МИНИМАЛЬНОЙ  
ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ НЕЙРОБЛАСТОМЕ ПУТЕМ ОЦЕНКИ  
ЭКСПРЕССИИ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ ГЕНОВ С  
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ**

Научный руководитель:  
старший научный сотрудник лаборатории  
генетических биотехнологий научного  
отдела ГУ «Республиканский научно-  
практический центр детской онкологии,  
гематологии и иммунологии»  
А. А. Мигас

Минск, 2019

## РЕФЕРАТ

Дипломная работа: 52 страницы, 13 рисунков, 19 таблиц, 53 источника.

Нейробластома, минимальная остаточная болезнь (МОБ), полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени, *TH*, *RHOX2B*, *PLK1*, *MYSN*.

Объекты исследования: костный мозг (КМ), периферическая стволовая клетка, опухолевая ткань пациентов РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии с нейробластомой группы высокого риска; КМ здоровых доноров; клеточная линия нейробластомы IMR-32.

Цель исследования: разработать метод определения МОБ по показателям экспрессии ассоциированных с нейробластомой генов с помощью полуколичественной ПЦР в режиме реального времени в образцах КМ у детей с диагнозом нейробластома группы высокого риска.

Методы исследования: выделение клеток костного мозга методом лизиса эритроцитов, культивирование клеточной линии нейробластомы IMR-32, выделение тотальной клеточной РНК, синтез кДНК, полуколичественная ПЦР в реальном времени.

Результаты работы:

1. Экспрессия генов *PLK1* и *MYSN* не может являться маркером нейробластомы при оценке МОБ в КМ в связи с высокой экспрессией данных генов в мононуклеарных клетках КМ.

2. Разработанный метод позволяет обнаруживать экспрессию генов *TH* и *RHOX2B*, обусловленную присутствием нейробластов в КМ, при наличии одной опухолевой клетки на  $10^4$  клеток КМ.

3. Была обнаружена связь между более высокими значениями экспрессии *TH* и *RHOX2B* и 4 стадией заболевания, высокой экспрессией *RHOX2B* у детей старше 18 месяцев.

4. На момент постановки диагноза уровни экспрессии  $TH > 0,001$  и  $RHOX2B > 0,0001$  в образцах КМ связаны с более низкими показателями общей выживаемости (ОВ) ( $11,9 \pm 10,3\%$ ,  $19,7 \pm 10,8\%$ ) и бессобытийной выживаемости (БСВ) ( $17,8 \pm 7,8\%$ ,  $23,3 \pm 7,7\%$ ). На момент перед аутотрансплантацией КМ уровень экспрессии  $TH > 0,0017$  связан с низким показателем ОВ ( $25 \pm 21,6\%$ ), уровень  $TH > 0,0004$  связан с худшей БСВ (0%). Уровень экспрессии  $RHOX2B > 0,0002$  на момент перед аутотрансплантацией связан с более низким показателем ОВ ( $20 \pm 17,9\%$ ). Наличие экспрессии *RHOX2B* на данном этапе связано с худшей БСВ (0%).

## РЭФЭРАТ

Дыпломная работа: 52 старонкі, 13 малюнкаў, 19 табліц, 53 крыніцы.

Нейрабластома, мінімальная астаткавая хвароба (МАХ), палімеразная ланцуговая рэакцыя (ПЛР) у рэальным часе, *TH*, *RHOX2B*, *PLK1*, *MYSN*.

Аб'екты даследавання: касцяны мозг (КМ), перыферычная ствалавая клетка, пухлінная тканіна пацыентаў РДПЦ дзіцячай анкалогіі, гематалогіі і імуналогіі з нейрабластомай групы высокай рызыкі; КМ здаровых донараў; клеткі лініі нейрабластомы IMR-32.

Мэта даследавання: распрацаваць метады вызначэння МАХ па паказчыках экспрэсіі асацыіраваных з нейрабластомай генаў з дапамогай полуколькаснай ПЦР ў рэжыме рэальнага часу ў КМ дзяцей з дыягназам нейрабластома групы высокай рызыкі.

Метады даследавання: вылучэнне клетак касцянога мозгу метадам лізіса эрытрацытаў, культываванне клетачнай лініі нейрабластомы IMR-32, вылучэнне татальнай клеткавай РНК, сінтэз кДНК, полуколькасная ПЛР у рэальным часе.

Вынікі працы:

1. Экспрэсія генаў *PLK1* і *MYSN* не можа з'яўляцца маркерам нейрабластомы пры ацэнцы МАХ у КМ у сувязі з высокай экспрэсіяй дадзеных генаў у монануклеарных клетках КМ.

2. Распрацаваны метады дазваляе выяўляць экспрэсію генаў *TH* і *RHOX2B*, абумоўленую прысутнасцю нейрабластаў у КМ, пры наяўнасці адной пухліннай клеткі на  $10^4$  клетак КМ.

3. Была знойдзена сувязь паміж больш высокімі значэннямі экспрэсіі *TH* і *RHOX2B* і 4 стадыяй хваробы, высокай экспрэсіяй *RHOX2B* у дзяцей, старэйшых за 18 месяцаў.

4. На момант пастаноўкі дыягназу ўзроўні экспрэсіі  $TH > 0,001$  і  $RHOX2B > 0,0001$  у КМ звязаны з больш нізкімі паказчыкамі агульнай выжывальнасці (АВ) ( $11,9 \pm 10,3\%$ ,  $19,7 \pm 10,8\%$ ) і безпадзейнай выжывальнасці (БПВ) ( $17,8 \pm 7,8\%$ ,  $23,3 \pm 7,7\%$ ). На момант перад аўтатрансплантацыяй КМ узровень экспрэсіі  $TH > 0,0017$  звязаны з нізкім паказчыкам АВ ( $25 \pm 21,6\%$ ), узровень  $TH > 0,0004$  звязаны з горшай БПВ (0%). Узровень экспрэсіі  $RHOX2B > 0,0002$  на момант перад аўтатрансплантацыяй звязаны з больш нізкім паказчыкам АВ ( $20 \pm 17,9\%$ ). Наяўнасць экспрэсіі *RHOX2B* на дадзеным этапе звязана з горшай БПВ (0%).

## ABSTRACT

Diploma project: 52 pages, 13 figures, 19 tables, 53 references.

Neuroblastoma, minimal residual disease (MRD), real-time polymerase chain reaction (real-time PCR), *TH*, *PHOX2B*, *PLK1*, *MYCN*.

Research objects: bone marrow (BM), peripheral stem cell, tumor tissue of high-risk neuroblastoma patients of the Republican Centre for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology; BM of healthy donors; neuroblastoma cell line IMR-32.

Purpose of research: develop a method for neuroblastoma MRD monitoring based on the expression of neuroblastoma-associated genes in BM samples of high risk neuroblastoma patients using semi-quantitative real-time PCR.

Research methods: extraction of BM cells by erythrocyte lysis, IMR-32 neuroblastoma cell line cultivation, isolation of total cellular RNA, cDNA synthesis, semi-quantitative real-time PCR.

Following results were obtained:

1. The *PLK1* and *MYCN* genes cannot be included in the diagnostic panel for MRD monitoring due to the high expression level of these genes in normal BM cells.
2. The developed method allows detecting the expression of the *TH* and *PHOX2B* genes, due to the presence of neuroblasts in the BM with the presence of one tumor cell per  $10^4$  BM cells.
3. There was found relation between higher *TH* and *PHOX2B* expression values and stage 4 disease, and high *PHOX2B* expression in children over 18 months of age.
4. At the time of diagnosis, the expression levels of  $TH > 0,001$  and  $PHOX2B > 0,0001$  in BM samples are associated with lower overall survival (OS) ( $11,9 \pm 10,3\%$ ,  $19,7 \pm 10,8\%$ ) and event-free survival (EFS) ( $17,8 \pm 7,8\%$ ,  $23,3 \pm 7,7\%$ ). At the time before BM autotransplantation  $TH > 0,0017$  is associated with a low OS ( $25 \pm 21,6\%$ ),  $TH > 0,0004$  is associated with the worst EFS (0%). The expression level of  $PHOX2B > 0,0002$  at the time before autotransplantation is associated with a lower OS ( $20 \pm 17,9\%$ ). The presence of *PHOX2B* expression at this stage is associated with the worst EFS (0%).