

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

**PERSONALIZĒTA KRŪTS VĒŽA MOLEKULĀRĀ  
DIAGNOSTIKAS TESTA IZSTRĀDE INDIVIDUĀLI  
PIELĀGOTAI ĀRSTNIECĪBAS IZVĒLEI UN SLIMĪBAS  
GAITAS NOVĒROŠANAI**

Maģistra darbs

Autors: Artūrs Bušs

Stud. apl. Nr. ab18152

Darba vadītājs: Asoc.prof. Aija Linē

Recenzents: Dr.biol. Dace Pjanova

RĪGA 2020

## Kopsavilkums

Šī darba mērķis ir izstrādāt krūts vēža molekulāro diagnostikas testu, kas balstās uz somatisko mutāciju noteikšanu audzēja audos un to izsekošanu asinīs slimīgas gaitā. Lai noteiktu somatiskās mutācijas, tika veikta 121 gēna mērķētā sekvencēšana audzēja audu un asins šūnu genomiskās DNS paraugos un izvērtēta atrasto mutāciju bioloģiskā nozīme. No pacientu asins paraugiem tika izolēta šūnu brīvā DNS (cfDNS) un ārpusšūnu vezikulas (EVs), un atlasītas mutācijas, ko paredzēts testēt šajos paraugos. Darba turpinājumā paredzēts salīdzināt divu veidu šķidro biopsiju testus – mutāciju kvantificēšanu cfDNS paraugos, izmantot pilienu digitālo PCR (ddPCR) un EV-iekļautās RNS sekvenēšanu.

Atslēgas vārdi: Krūts vēzis; Šķidrā biopsija; Šūnu brīvā DNS, Ārpusšūnu vezikulas, Somatiskās mutācijas.

## Summary

### Development of a precision medicine test for the therapeutic decisions and monitoring of treatment response in breast cancer

The aim of this study was to develop a precision medicine test, which is based on the detection of somatic mutations in breast cancer patient tissues and monitoring them in the circulation during the progression of the disease. Targeted sequencing was used on 121 genes in tumor tissue and blood cell genomic DNA to determine somatic mutations. Biological significance of these mutations were evaluated. Cell-free DNA (cfDNA) and extracellular vesicles (EVs) were isolated from patient blood samples and specific mutations were planned to be tested in these samples. It was planned to compare two liquid biopsy approaches – quantification of mutations in cfDNA samples using digital droplet PCR (ddPCR) and sequencing of EV-enclosed RNA.

Key words: Breast cancer; Liquid biopsy; Cell-free DNA; Extracellular vesicles; Somatic mutations.

# SATURA RĀDĪTĀJS

Saīsinājumi	6
Ievads	7
1. Literatūras apskats	10
1.1 Krūts vēzis un tā anatomija	10
1.2 Krūts vēža iedalījums	13
1.2.1 Klīniskie un patoloģiskie parametri stadijas izvērtēšanai	15
1.2.2 Krūts vēža klasifikācija	19
1.3 Krūts vēža ģenētika	21
1.4 Krūts vēža diagnostika	26
1.4.1 Agrīnā diagnostika	26
1.5 Krūts vēža terapija	29
1.5.1 Ķīmijterapija un hormonālā terapija	30
1.5.2 Imūnterapija	31
1.5.3 Ķirurģija	33
1.5.4 Radiācijas terapija	33
1.5.5 Molekulāro signālceļu ietekmējošie medikamenti	34
1.6 Šķidrās biopsijas	37
1.6.1 Cirkulējošās audzēja šūnas	38
1.6.2 Ārpusšūnu vezikulas	38
1.6.3 Šūnu brīvā RNS	40
1.6.4 Šūnu brīvā DNS	41
3. Materiāli un metodes	42
3.1 Materiāli	42
3.2 Darba drošības tehnika	45
3.3 Asins paraugu apstrāde	45

3.4 Šūnu brīvā DNS izdalīšana	46
3.5 DNS raksturošana	47
3.6 Bibliotēku garuma selekcija	48
3.7 DNS izdalīšana no FFPE	48
3.8 Bibliotēku konstruēšana	49
3.9 Sekvencēšana un datu apstrāde	49
3.10 Kvantitatīvā PQR	50
4. Rezultāti un diskusija	52
4.1 Šūnu brīvās DNS asins stobru izvēle	52
4.2 Pētījumā iesaistītie pacienti	56
4.3 Sekvencēšana	57
4.4 Audos atrasto mutāciju analīze	57
4.4.1 Pirmais pacients	58
4.4.2 Otrais pacients	59
4.4.3 Trešais pacients	60
4.4.4 Ceturtais pacients	61
4.5 Personalizētas medicīnas metodes krūts vēža terapijas izvēlei	61
4.6 Potenciāls agrīnā krūts vēža diagnostikā	64
4.7 Potenciāls terapijas efektivitātes un atgriešanās riska izvērtēšanā	65
4.8 Plānotais projekta turpinājums	68
4.8.1 Somatisko mutāciju kandidāti monitoringam	68
4.8.2. Ārpusšūnu vezikulu analīze	69
4.8.3. Klīniskā interpretācija	69
5. Secinājumi	71
6. Pateicības	72
7. Atsauces	73

## SAĪSINĀJUMI

- EVs – Ekstracelulārās vezikulas.
- cfDNS – Cirkulējošā šūnu brīvā DNS
- cfRNS – Cirkulējošā šūnu brīvā RNS.
- CTCs – Cirkulējošās audzēja šūnas.
- AJCC- *American Joint Committee on Cancer.*
- ER – Estrogēna receptors.
- PR- Progesterona receptors.
- IHC- Imunohistoķīmija.
- PBS – Phosphate-buffer saline.
- FGF3/4/19– Fibroblastu augšanas faktors 3/4/19.
- FGFR– Fibroblastu augšanas faktora receptors.
- SEC – Izmēru izslēgšanas hromatogrāfija.
- MDM2– MDM2 proto-onkogēns.
- P53 - Audzēju supresorgēns P53.
- CCND1 - Ciklīna D kodējošais gēns.
- FNI – Fibronektīna 1 kodējošais gēns.
- ITCH – *Itchy E3 ubiquitin protein ligase.*
- ZNF703 – Cinka pirksta proteīns 703.
- ERCC4 – *ERCC excision repair 4.*
- EMT – Epiteliāli-mezenhimalā tranzīcija.
- MI – Mikroviļņu vizualizācijas metodes.
- PCGF2 – *Polycomb group ring finger 2.*
- NCOR1 – Kodola receptora ko-represors 1.
- RAD50– Dubultpavediena labošanas proteīna kodējošais gēns.
- RAD51 – RAD51 rekombināzes kodējošais gēns.
- ERBB2/3 – Erb-b2 receptora tirozīna kināze 2.
- EGFR – Epidermālais augšanas faktora receptora kodējošais gēns.
- PALB2 – BRCA2 Partner and localizer kodējošais gēns.
- BRIP1 – BRCA1 mijiedarbojošais proteīna C-termināla helikāzes 1 kodējošais gēns.
- STK11 – Serīna/Treonīna kināzes 11 kodējošais gēns.
- PTEN – Fosfatāzes un tensīna homologa kodējošais gēns.
- MRI – Magnētiskā rezonanse.
- CT – Datortomogrāfija.
- PET – Protonu emisijas tomogrāfija.
- NOTCH1/2 – *Notch 1/2.*
- MYC – MYC proto-onkogēns.
- WHO – Pasaules Veselības Organizācija.
- FNA – Tievās adatas aspirācija.
- SERM- Selektīvie estrogēna receptora modulatori.
- AI – aromatāzes inhibitori.
- TAM – tamoksifēns.
- PD1/PDL1 – Programmētā šūnu nāve/ligands 1.
- CHEK2 – Kontrolpunkta kināzes 2 kodējošais gēns.
- PI3K – Fosfoinositīda 3 kināze.
- mTOR – *Mammalian target of rapamycin.*
- AKT –Proteīna kināze B.
- HDAC – Histonu deacetilāze.
- CDK4 – Cikla atkarīgā kināze 4.
- PARP –Poly-ADP ribose polymerase.
- CD9/63/81 –Tetraspanīns 9/63/81.
- ddPCR – Digitālais droplet PCR.
- MA – Mikrorindu tests.
- RT-qPCR – Reālā laika kvantitatīvā PCR.
- TNBC – Trīskārtēji negatīvais krūts vēzis.
- LCIS – Lobulāra karcinoma *in situ.*
- DCIS – Duktāla karcinoma *in situ.*
- AURKA –.Aurora kināzes A kodējošais gēns.
- PIK3CA – p110 $\alpha$  kodējošais gēns.
- TP53 – P53 kodējošais gēns.
- MAP3K1- Mitoģen-aktivētas proteīna kināzes kināzes kināzes kināze.
- BRCA1/2–. BRCA1/2 kodējošais gēns.
- MUC16 – Mucīna 16 kodējošais gēns.
- GATA3 – GATA saistošā proteīna 3 kodējošais gēns.
- TTN – Titīna kodējošais gēns.
- CDH1 – Kadherīns 1.
- TSG101 – Audzēja uzņēmības gēns 101.
- SYNE1 – Spektrīna atkārtojuma saturošā kodola apvalka proteīna 1 kodējošais gēns.
- LumA/B – Luminal A / Luminal B.
- KMT2C –Lizīna metiltransferāzes 2 kodējošais gēns.
- FFPE – Formalinā fiksēts, parafinā iekļauts.

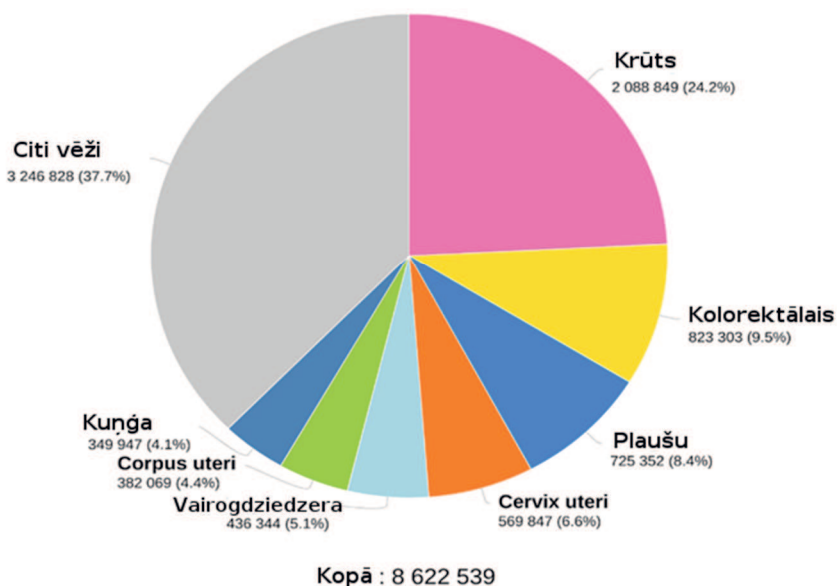
## IEVADS

Krūts vēzis ir otrais visbiežāk sastopamais vēža veids pasaulē un visbiežāk sastopamais vēža veids sievietēm ar aptuveni 2 miljoniem jauniem, klīniski diagnosticētiem gadījumiem gadā, sastādot 24.2% no kopējā vēža gadījumu skaita, kā arī tas ir piektais visbiežāk sastopamākais vēža izraisītais nāves iemesls pasaulē (1. attēls). Latvijā, 2018. gadā, tika diagnosticēti 1 266 krūts vēža gadījumi, kas ir 20.8% no visiem vēža saslimšanas gadījumiem, ieņemot visbiežāk sastopamā vēža veida pozīciju sievietēm (2. attēls) (Anonymous 2020). Lai gan Latvijā reizi divos gados ir pieejams bezmaksas krūts vēža skrīnings sievietēm vecumā no 50-69 gadu vecumam, ko nodrošina valsts, taču daudzas sievietes šo iespēju neizmanto, līdz ar to pazaudējot iespēju agrīni diagnosticēt ļaundabīgu audzēju veidošanos. Veselības ministrija sniegusi informāciju par 2009. un 2010. gadu, kurā atbilstošā vecuma sievietēm tika izsūtīti 286 785 uzaicinājumi uz krūts vēža skrīningu - mamogrāfiju, taču realitātē uz šo pārbaudi ieradās tikai 57 340 sievietes, kas sastāda tikai 20% no kopējā skaita. Laicīga krūts vēža diagnostika ir nopietna problēma visā pasaulē, ko izraisa cilvēku zināšanu vai skrīninga iespēju trūkums (Anonymous 2011).

Personalizēta medicīna ir katra individuālā pacienta diagnostikas un terapijas izvēles taktika, balstoties uz audzēja ģenētisko izmaiņu profilu, pacienta slimības vēsturi, komorbiditātēm, klīniskiem notikumiem un vides faktoriem. Šī sfēra ir eksponenciāli attīstījusies pēdējo divdesmit gadu laikā, it īpaši pēc pacientu ģenētiskā materiāla analīzes pilnveidošanās, ļaujot izprast ģenētisko izmaiņu nozīmi slimības izcelsmē, gaitā un terapijā. Nepieciešamība pēc personalizētās medicīnas ir parādījusies vēža terapijā, jo pirmās izvēles medikamentu grupas bieži nesniedz terapeitisko efektu dēļ pacienta ģenētiskajām izmaiņām, vecuma, uztura, veselības statusa kā arī vides un epiģenētiskiem faktoriem. Ģenētisko izmaiņu detektēšana audzēju audos ir viena no pēdējos gados aktualizētām tēmām slimības savlaicīgā diagnostikā, terapijas izvēlē kā arī turpmākajā slimības gaitas prognostikā (Vogenberg et al. 2010). Iedzimtas mutācijas, lai gan piedalās slimības riska palielināšanā, nesniedz informāciju par pacienta slimības gaitu, tāpēc terapijas izvēlē un prognostikā tiek pielietota somatisko mutāciju analīze. (Cutter and Liu 2012). Kā viens no daudzsoļākiem vēža diagnostikas, prognostikas un dinamiskas novērošanas testiem nākotnē varētu būt pacientu šķidro biopsiju analīze. Šķidrās biopsijas ir cilvēku bioloģiskos šķidrums brīvi cirkulējošās DNS (cfDNS), RNS (cfRNS), cirkulējošās audzēja šūnas (CTCs) un ārpusšūnu vezikulas (EVs). Ir izvirzīta teorija, ka krūts vēža pacientu asinsritē cirkulējošais cfDNS un EV iekļautais RNS spēj reprezentēt audzēja audu somatiskās mutācijas, tādējādi dodot iespēju monitorēt izmaiņas audzēja

audos un pēc šīm izmaiņām savlaicīgi prognozēt klīniskos notikumus, piedāvāt pielāgotu terapiju kā arī izvērtēt pielietotās terapijas efektivitāti (Bronkhorst et al. 2019).

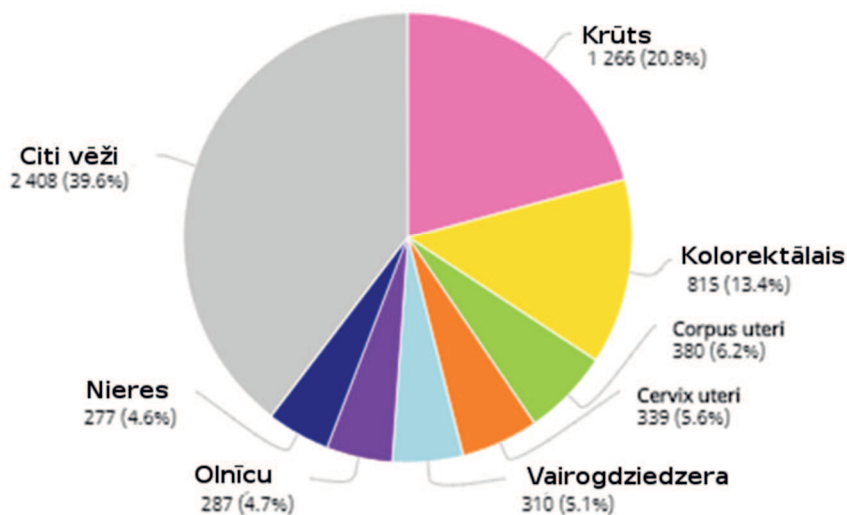
**Jauni klīniskie gadījumi 2018.gadā, pasaulē, sievietēm, visās vecuma grupās**



1.attēls- Jauni diagnosticētie audzēji sievietēm pasaulē, 2018.gadā, visās vecuma grupās. Attēls pielāgots balstoties uz (Anonymous 2020).

Figure 1 – Newly diagnosed breast cancer patients in the World, year 2018, all ages, women. Image was adapted based on (Anonymous 2020).

**Jauni klīniskie gadījumi 2018.gadā, Latvijā, sievietēm, visās vecuma grupās**



2.attēls- Jauni diagnosticētie audzēji sievietēm Latvijā, 2018.gadā, visās vecuma grupās. Attēls pielāgots balstoties uz (Anonymous 2020).

Figure 2 – Newly diagnosed breast cancer patients in Latvia, year 2018, all ages, women. Image was adapted based on (Anonymous 2020).

Šī darba mērķis ir personalizēta molekulārā diagnostikas testa izstrāde, kas balstās uz mutāciju detektēšanu audzēja audos, šo pašu mutāciju detektēšanu cfDNS un EVs, kā arī atrasto mutāciju bioloģiskā un klīniskā nozīmīguma analīze klīnisko notikumu gaitā, krūts vēža pacientiem.

Mērķa sasniegšanai tiek izvirzīti sekojoši uzdevumi:

1) Noteikt somatiskās mutācijas krūts vēža pacienšu audu paraugos, veicot 121 gēna mērķēto sekvenēšanu audzēja un asins šūnu DNS paraugos;;

(2) Optimizēt metodi, lai iegūtu vislielāko daudzumu, augstas kvalitātes cfDNS;

(3) Izolēt cfDNS no pacientu plazmas paraugiem, lai tajā testētu audzēja somatiskās mutācijas;

Sākotnēji šajā darbā bija paredzēts salīdzināt divu veidu šķidrās biopsijas – audzējā atrasto somatisko mutāciju kvantificēšanu asins cfDNS paraugos, izmantojot digitālo pilienvēda PCR (ddPCR) un EV iekļautās RNS sekvenēšanu. Taču COVID-19 pandēmijas sakarā noteikto ierobežojumu dēļ un ar tiem saistītās preču piegādes kavēšanās dēļ darbu nebija iespējams īstenot plānotajā apjomā.

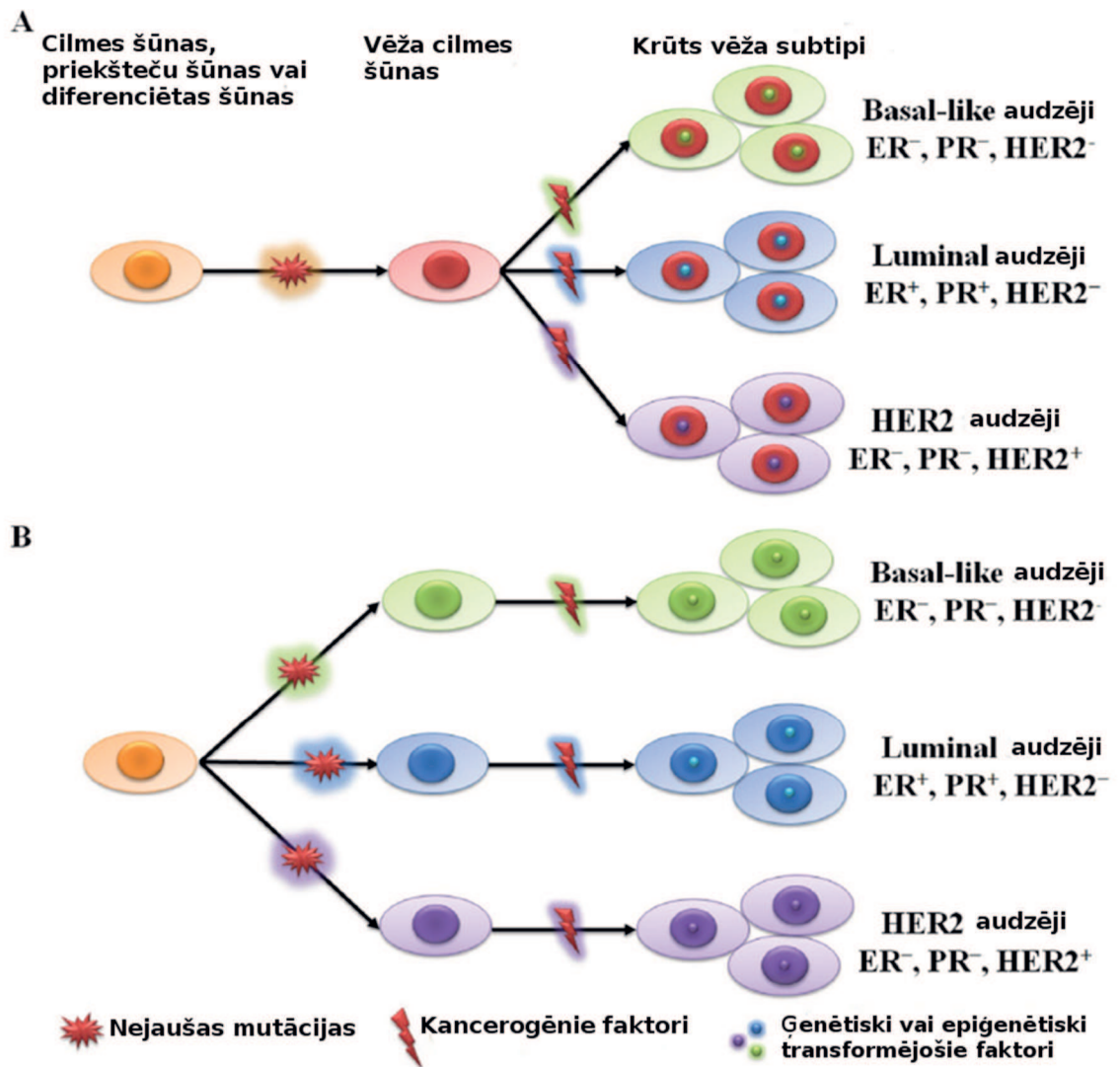
# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1 Krūts vēzis un tā anatomija

Krūts vēzis ir ļoti heterogēns. To raksturo audzēja izmērs, stadija, histoloģiskā pakāpe, skartie limfmezgli, metastāžu veidošanās, dažādi mutāciju profili, kā arī tādi imunohistoķīmijas (IHC) marķieri kā estrogēna receptors (ER), progesterona receptors (PR) un cilvēka epidermālais augšanas faktora receptors 2 (HER2/neu). ER un PR ekspresiju nosaka izmantojot IHC. Krāsojums, kas pārsniedz 1% no krāsotajām šūnām tiek uzskatīts par pozitīvu gan ER, gan PR gadījumā (Badve 2018). Lai gan gēnu ekspresija daudz padziļinātāk raksturo audzēja subtipu, šāda pieeja ir daudz dārgāka, tāpēc klīniskajā praksē visbiežāk krūts vēzis tiek klasificēts pēc IHC marķieriem, lai prognozētu audzēja uzņēmību uz hormonālo terapiju un ķīmijterapiju. Papildus molekulārajai heterogenitātei, klasifikāciju apgrūtina arī ģenētiskā heterogenitāte, ko raksturo atšķirības starp divu pacientu viena tipa audzējiem (*inter-tumor* heterogenitāte) vai pat starp tā paša pacienta diviem audzēja paraugiem (*intra-tumor* heterogenitāte).

Krūts vēža gadījumu skaits ir pieaudzis pēdējo 50 gadu laikā. To skaidro ar skrīninga (mamogrāfijas) ieviešanu, kā arī ar faktu, ka daudzām sievietēm pirmā grūtniecība noris novēlotā vecumā, sākot no 30 gadiem. Katru gadu, par ko nobīdās menopauzes iestāšanās, krūts vēža risks pieaug par 3% (Surakasula et al. 2014). Pirms menopauzes vecuma sievietēm ar krūts vēzi ir novērota korelācija ar palielinātu ķermeņa masas indeksu, taču pēc menopauzes vecuma sievietēm šāda korelācija ir novērota tieši ar vēdera tauku krokas apkārtmēru, kas ir aptuveni >90cm (Harbeck et al. 2019).

Pastāv divas teorijas, kuras izskaidro krūts vēža iniciāciju un progresiju. Pirmā teorija tiek saukta par vēža cilmes šūnu teoriju un otra- stohastiskā teorija. Cilmes šūnu teorija balstās uz pieņēmumu, ka visi audzēja subtipi izceļas no viena veida vēža cilmes šūnām vai priekšteču šūnām. Epiģenētiskās vai iedzimtās mutācijas izsauc vēža cilmes šūnu / priekšteču šūnu diferenciāciju (3.attēls -A). Stohastiskā teorija balstās uz pieņēmumu, ka katrs audzēja subtips izceļas no atsevišķas, noteikta veida šūnas – Cilmes šūnas, diferencētas šūnas, priekšteču šūnas (3. attēls- B). Mutācijas, laika gaitā, spēj uzkrāties krūts audu šūnās un uzsākt transformāciju par audzēja šūnām, kad ir sasniegts noteikta mutāciju daudzums. Abas teorijas ir pamatotas un pierādītas, taču neviena no abām teorijām nespēj precīzi noraksturot krūts vēža iniciāciju un progresiju (Sun et al. 2017).



3. attēls – Divas krūts vēža iniciācijas un progresijas teorijas. A – Cilmes šūnu teorija. B – Stohaistiskā teorija. Attēls pielāgots balstoties uz (Sun, Zhao et al. 2017)

Figure 3 – Two theories describing breast cancer initiation and progression. A – Stem cell theory. B – Stochastic theory. Image was adapted based on (Sun, Zhao et al. 2017).

Krūts vēža riska faktorus iedala divās grupās, atkarībā no tā vai šos faktorus pacients spēj ietekmēt:

**Neietekmējamie:**

- Dzimums (sieviete) un novecošana ir divi faktori, kas visvairāk ietekmē krūts vēža veidošanos risku un nav ietekmējami;
- Iedzimtas ģenētiskas mutācijas vai krūts vēzis ģimenes slimības vēsturē ir faktors, ko nevar ietekmēt un tas ir būtisks riska faktors (Brewer et al. 2017);
- Iedzimtas slimības, piemēram, atipiska duktālā hiperplāzija, kas visbiežāk nav ļaundabīga vai pat pirms-vēža stadija, bet tā var piedalīties kā ierosinātājs krūts vēzim (Menes et al. 2017);

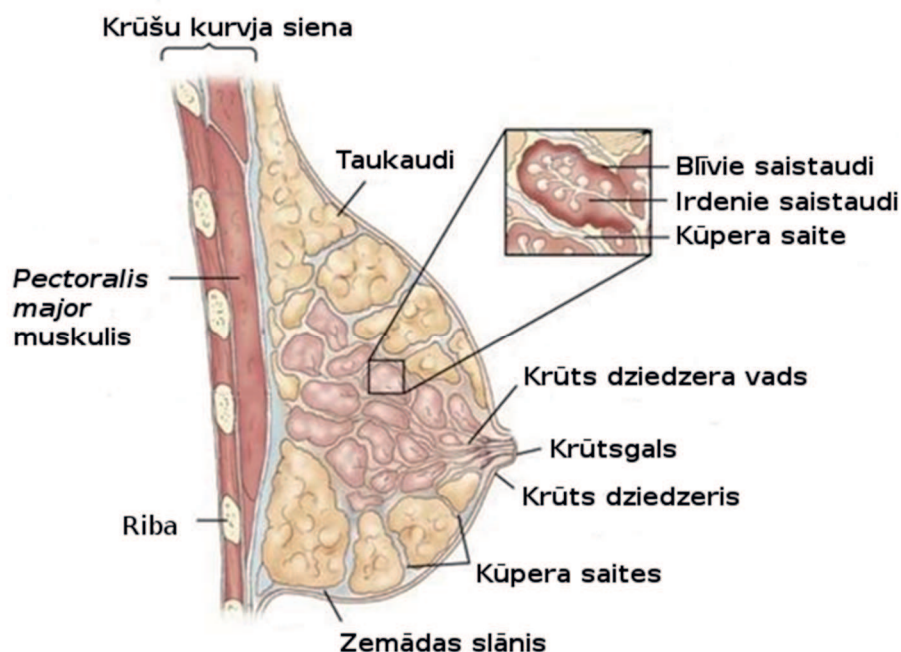
- d) Endogēnie hormoni- olnīcu un virsnieru izstrādātie hormoni, kas perifērajos taukaudos tiek pārveidoti estrogēnā, piedalās palielināta riska faktora veidošanās procesā (Hankinson 2005).

### **Ietekmējamie:**

- a) Eksogēni hormoni- Estrogēna un progesterona hormonālo līdzekļu aizstāj-terapijas lietošana, lai mazinātu menopauzē radīto blakusefektu parādīšanos, kā arī perorālās hormonālās kontracepcijas lietošana pirms menopauzes vecumā (Heikkinen et al. 2016);
- b) Bērna barošana ar krūti samazina krūts vēža veidošanās risku (Anstey et al. 2017);
- c) Pārmērīga alkohola lietošana un smēķēšana;
- d) Ievērojami palielināts ķermeņa masas indekss, īpaši pēc-menopauzes vecumā, liekajiem taukaudiem producējot estrogēnu;
- e) Augsta radioaktivitāte- Tas skāra sievietes Černobiļas, Hirosimas un Nagasaki tuvumā, palielinot vēža, tai skaitā krūts vēža, veidošanās risku (Ogrodnik et al. 2013)
- f) Uzturs- Ievērojami palielināta piesātināto taukskābju pārtikas lietošana uzturā (Xia et al. 2015).
- g) Sēdošs dzīves veids un mazkustīgums (Toklu and Nogay 2018).

### **Krūts anatomija**

Krūts atrodas pie krūšu kurvja, aiz ribām un muskuļu slāņa un pilda nozīmīgu lomu piena izstrādē jaundzimušajiem. Krūts galvenokārt sastāv no krūts dziedzeru un taukaudiem. To iedala krūts dziedzeru vadu un vadiņos, kas ir savienoti ar krūtsgalu, 8-20 dziedzeru daivās un daiviņās. Katra daiviņa sastāv no aptuveni 30 alveolām. Krūti balsta divi šķiedraudu slāņi – ‘kūpera saites’ un krūškurvja sienas muskuļi. Krūts limfvadus iedala divās grupās: (1) Mediālie limfvadi – to virziens ir uz iekšējiem krūts limfvadiem. (2) Iekšējie limfvadi – to virziens arī ir prom no krūtsgala un tie zem atslēgas kaula savienojās ar otras krūts limfmezgliem. Krūts asins apgādi nodrošina iekšējās krūšu kurvja, paduses un starpribu artērijas (4. attēls) (Badve 2018).



4. attēls – Krūts anatomija. Attēls pielāgots balstoties uz (Anonymous 2019).

Figure 4 – Breast anatomy. Image was adapted based on (Anonymous 2019).

## 1.2 Krūts vēža iedalījums

Krūts vēža klasifikācija tiek pielāgota jauniem pētījumu datiem, kas atbilstoši audzēja marķieriem izmaina pielietoto terapiju un audzēja izsekošanu pēc terapijas.

Pēdējo divdesmit gadu laikā ir mainījusies izpratne par krūts vēža bioloģiju, pieņemot to kā slimību kopumu, ko raksturo molekulārie marķieri – gēnu ekspresijas profili, imunohistoķīmiskie marķieri, proteomika, nākamās paaudzes sekvenčēšana un citas molekulārās metodes. Šo faktoru izvērtēšana noved pie klasifikācijas atjaunošanas, ko veic katrā *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) publicētajā TNM klasifikācijas raksturojumā. Lai gan TNM klasifikācija tika izveidota jau 1959. gadā, nebija pietiekami saprotams veids kā iedalīt audzēja subtipus, līdz ar to, iedalījums tika veikts pēc laika perioda, kurā pacienti nomira, pēc radikālas mastektomijas un krūšu kurvja staru terapijas. Iedalījums tika tālāk attīstīts, lai izdalītu terapijas nepieciešamību agrīni atklātiem krūts vēža gadījumiem, pasargājot pacientus no liekas operācijas veikšanas vai pielietotās radiācijas saistītām sekām. Pēdējais AJCC onkoloģiskās klasifikācijas izdevums ir izdots 2018. gadā (Badve 2018).

Audzēju klasifikāciju veic pēc sekojošajiem kritērijiem:

- a) Invazīvs audzējs / *In situ*- Atkarībā no audzēja spējas migrēt un metastāzēt, to iedala audzējos, kuri atrodas sākotnējā lokalizācijā, tiek uzskatīti par ‘pirms-veža stadiju’, tie nav izplatījušies - nav šķērsojuši bazālo membrānu. Tiek pieskaitīti pie intraduktālajiem, pre-invazīviem audzējiem, jeb *Carcinoma in situ*; Invazīvie audzēji ir agresīvāki, spēj šķērsot bazālo membrānu, migrēt un metastāzēt, izplatoties sekundārās organisma lokācijās, piekļūstot asinsvadiem un limfvadiem. Pie tiem pieskaita I-IV stadijas audzējus.
- b) Histoloģiskie subtipi- Histoloģiskos parametrus nosaka pēc to lokalizācijas krūti. Pie visbiežākā krūts vēža histoloģiskā subtipa pieskaita audzēja lokalizāciju krūts dziedzerā vados, jeb duktālā karcinoma, kas sastāda 80-85% no visiem krūts vēža saslimšanas gadījumiem. Otrais, biežāk sastopamais vēža subtips pēc lokalizācijas ir audzējs, kas veidojās krūts dziedzerā daivās un daiviņās, jeb lobulārā karcinoma, sastādot 10-15% no visiem gadījumiem. Lobulārie audzēji ir grūtāk noraksturojami, jo tie nav viendabīgas masas un histoloģiski, bieži, ir grūti noteikt to patiesos izmērus. Retāk, audzējs var veidoties stromā: saistaudos, taukaudos vai asinsvados – sarkomas.
- c) Molekulārie subtipi – Atkarībā no ER, PR, HER2 audzēji tiek iedalīti subtipos, Ja receptori ir pozitīvi, tie tiek marķēti ar ‘+’, ja negatīvi, tad ar ‘-’. Trīskārtēji negatīvie audzēji ir tādi, kuri ir negatīvi uz visiem trīs receptoriem. Audzēji tiek sadalīti *Luminal A*, *Luminal B*, *Her2+* un *TNBC*.
- d) Diferenciācijas pakāpe (*Grade*)- Iedala trīs apakšgrupās, atkarībā no audzēja audu diferenciācijas pakāpes, kuru nosaka analizējot audu griezumus. Jo mazāk diferencēti audi, jo lielāka novirze no normāliem audiem. 1) Labi diferencēti audi, kas atgādina krūts audus, taču tās ir vēža šūnas; 2) Vidēji diferencēti audi; 3) Slikti diferencēti audi, kas vairs neatgādina normālus krūts audus.
- e) Stadija (*Stage*)- Tiek iedalīts atkarībā no tā, cik liels ir audzējs (Tis; T 0-4), cik un vai ir skarti limfmezgli (N 0-3) kā arī vai audzējs ir sācis metastāzēt (M 0-1). Iedala: 0, I, II, III, IV (5. attēls).

### 1.2.1 Klīniskie un patoloģiskie parametri stadijas izvērtēšanai

Krūts audzējus raksturo AJCC klasifikācijā pēc to klīniskajiem un patoloģiskajiem parametriem, jeb TNM sistēmas, pēc kuras audzēju var precīzāk iedalīt attiecīgās stadijās. Parametri iekļauj audzēju raksturojumu (T), skartos limfmezglus (N) un spēju metastāzēt (M).

**Audzēja raksturojums (T).** Audzēju raksturo pēc tā izmēra un lokalizācijas:

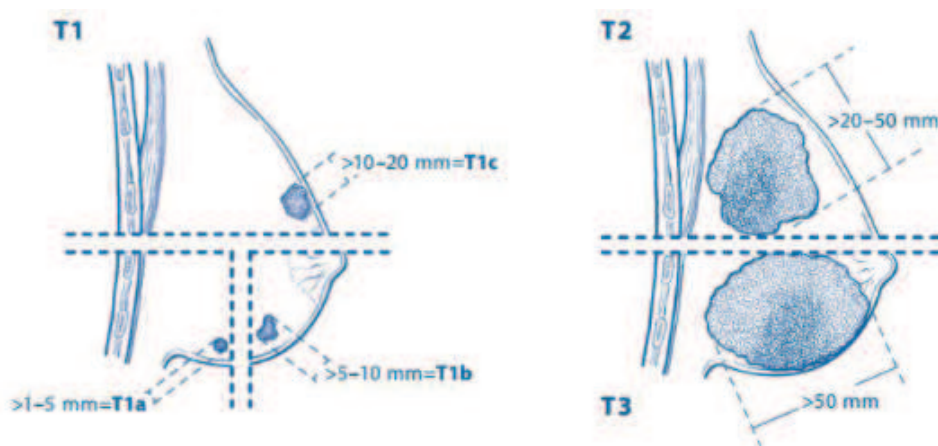
- a) **TX:** Primāro audzēja izvērtēšanu nevar veikt.
- b) **T0:** Nav pazīmes par primārā audzēja klātbūtni krūtī.
- c) **Tis:** *Carcinoma in situ*. Šo labdabīgo audzēju var iedalīt divās apakš-sadaļās:
  - Tis (DCIS) – Šo audzēju var noraksturot kā abnormālu šūnu veidojumu, kas atrodas krūts dziedzera kanālā un nav ticis ārpus šī kanāla. Ja daļa no šūnām tiek ārpus kanāla, tās tiek uzskatītas par invazīvām.
  - Tis (Paget disease) – Slimība, kurā krūts dziedzera (*areola*) ādas šūnās tiek atrasti abnormāli šūnu veidojumi, kas var izplatīties un skart visu krūts dziedzeri. Visbiežāk šī slimība ir labdabīga, taču tā var būt kā ierosinātājs krūts vēzim. Paget slimību neraksturo ar TNM klasifikāciju, taču klasifikācija stājās spēkā tad, kad abnormālie veidojumi sāk palikt par invazīvu krūts vēzi.
- d) **T1:** Iedalījums atkarīgs no audzēja izmēra, tāpēc to iedala četrās apakšgrupās:
  - T1mi: Audzējs, kura izmērs ir mazāks par vienu milimetru. Tiek saukts arī par mikroaudzēju.
  - T1a: Tiek pieskaitīts apakšgrupai, ja audzēja izmērs ir no viena milimetra līdz pieciem milimetriem.
  - T1b: Tiek pieskaitīts apakšgrupai, ja audzēja izmērs ir no pieciem milimetriem līdz vienam centimetram.
  - T1c: Tiek pieskaitīts apakšgrupai, ja audzēja izmērs ir no viena līdz diviem centimetriem (6.attēls).
- e) **T2:** Tiek pieskaitīts grupai, ja audzēja izmērs ir no diviem līdz pieciem centimetriem.
- f) **T3:** Tiek pieskaitīts grupai, ja audzēja izmērs ir lielāks nekā pieci centimetri.
- g) **T4:** Tiek pieskaitīti četrām apakšgrupām pēc audzēja lokalizācijas:
  - T4a: Audzējs ir ieaudzis krūšu kurvja sienā.
  - T4b: Audzējs ir ādā – Izveidojušies mazi audzēji, kas tiek uzskatīti kā primārais audzējs, uz krūts ādas izveidojusies čūla un āda ir pietūkusi.
  - T4c: Audzējs ir ārā un ir ieaudzis krūšu kurvja sienā.

- T4d: Iekaisīgais krūts vēzis (*Inflammatory breast cancer*), tiek saukts arī par *peau d'orange*: Vismaz trešdaļa no krūts ādas ir sārta un iekaisusi.

Anatomiskā stadija / Prognostiskās grupas			
Stadija 0	Tis	N0	M0
Stadija IA	T1*	N0	M0
Stadija IB	T0	N1mi	M0
	T1*	N1mi	M0
Stadija IIA	T0	N1**	M0
	T1*	N1**	M0
	T2	N0	M0
Stadija IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadija IIIA	T0	N2	M0
	T1*	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Stadija IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Stadija IIIC	Jebkāds T	N3	M0
Stadija IV	Jebkāds T	Jebkāds N	M1

5. attēls – Krūts vēža stadiju iedalījums atkarībā no izmēra, skartajiem limfmezgliem un spējas metastāzēt. Pielāgots balstoties uz (Badve 2018).

Figure 5 – Stage determination of breast cancer based on size, affected lymphnodes and ability to metastasize. Image was adapted based on (Badve 2018).



6. attēls – Krūts vēža audzēja klasifikācija balstoties uz audzēja izmēru. Attēls pielāgots balstoties uz (Badve 2018).

Figure 6 – Breast cancer classification based on tumor size. Image was adapted based on (Badve 2018).

**Limfmezglu raksturojums (N).** Limfmezglus raksturo pēc tā vai krūts vēzis tajos ir izplatījies, to izmēra un lokalizācijas. Kad audzējs ir ķirurģiski izgriezts, patologs to izvērtē izmantojot patoloģiskās stadijas klasifikāciju:

- a) **NX**: Nevar veikt limfmezglu izvērtēšanu.
  - b) **N0**: Limfmezglos nav novēroti kancerogēni veidojumi vai veidojumu izmērs ir mazāks par 0.2 milimetriem.
  - c) **N1**: Iedala četrās apakš-kategorijās:
    - N1mi: Audzējs ir izplatījies līdz paduses (*axillary*) limfmezgliem, ir lielāks par 0.2 milimetriem, taču nav lielāks par diviem milimetriem.
    - N1a: Audzējs ir izplatījies no viena līdz trīs limfmezgliem un vismaz vienā no limfmezgliem tā izmērs ir lielāks par diviem milimetriem.
    - N1b: Audzējs ir izplatījies līdz limfmezgliem, kas atrodas pie krūšu kaula, taču atrodas tajā pašā ķermeņa pusē, kur primārais audzējs, kā arī tā izmērs ir lielāks par 0.2 milimetriem. Audzēju atrod izmantojot *sentinel lymph node* biopsiju, taču tas nav atrodams paduses limfmezglos.
    - N1c: Audzējs ir izplatījies no viena līdz trīs paduses limfmezgliem un vismaz vienā no tiem ir audzējs, kura izmērs pārsniedz divus milimetrus. Audzēji ir atrodami arī limfmezglos pie krūšu kaula, taču tajā pašā ķermeņa pusē, kur atrodas primārais audzējs.
  - d) **N2**: Iedala divās apakš-kategorijās:
    - N2a: Audzējs ir izplatījies no četriem līdz deviņiem limfmezgliem un vismaz viens no audzējiem ir lielāks par diviem milimetriem.
    - N2b: Audzējs ir izplatījies līdz limfmezgliem pie krūšu kaula un to var detektēt ar diagnostiskajām iekārtām. Nav skarti limfmezgli paduses reģionā.
  - e) **N3**: Iedala trīs apakš-kategorijās:
    - N3a: Audzējs ir izplatījies līdz desmit vai vairāk limfmezgliem un vismaz viens no limfmezgliem ir lielāks par diviem milimetriem un ir skarti limfmezgli, kas atrodas zem atslēgas kaula.
    - N3b: Audzējs ir izplatījies no viena līdz deviņiem limfmezgliem un vismaz viens no limfmezgliem ir lielāks par diviem milimetriem. Izplatība ir notikusi līdz krūšu kaula limfmezgliem un audzējus var noteikt ar diagnostiskajām iekārtām;
- vai
- N3b: Audzējs ir izplatījies no četriem līdz deviņiem limfmezgliem un vismaz viens no limfmezgliem ir lielāks par diviem milimetriem. Izplatība ir notikusi

līdz krūšu kaula limfmezgliem un audzēja izmērs ir lielāks par diviem milimetriem, taču atrodas tajā pašā ķermeņa pusē, kur primārais audzējs, kā arī ir atrodams izmantojot diagnostikās iekārtām.

- N3c: Audzējs ir izplatījies līdz limfmezgliem virs atslēgas kaula, taču atrodas tajā pašā ķermeņa pusē, kur primārais audzējs.

**Metastāzes (M).** Raksturo audzēja spēju metastāzēt un attīstīties sekundārās lokācijās (Badve 2018).

M klasifikācija tiek pielietota, lai izvērtētu krūts vēža klīniski nozīmīgu attālu metastāžu atrašanos un noteiktu potenciāli iespējamu ilgtermiņa terapijas iespējamību. Lai gan izvērtējums galvenokārt balstās uz klīnisku un radiogrāfisku interpretāciju, tiek ieteikts arī diagnozi validēt ar patoloģisko izvērtējumu, ja tas ir iespējams. Iedala pēc sekojošas sistēmas:

- **M0:** Ja analizējot audzēju izmantojot klīniskās metodes (slimības vēsture, fizisks izmeklējums, diagnostisko vizualizācijas iekārtu izmantošana) netiek atklātas attālas metastāzes. M0 klasifikācija tiek pielāgota līdz tiek atrasti pierādījumi, ka metastāzes var dokumentēt klīniski vai veicot metastatiskās vietas biopsiju.
- **M1:** Ja tiek atrasta viena vai vairākas attālas metastāzes izmantojot klīniskās metodes vai diagnostikās vizualizācijas iekārtas.

Pie metastāzes pieskaita arī cirkulējošās audzēja šūnas, kaulu smadzeņu mikrometastāzes un izklidētās audzēja šūnas. Asinsritē cirkulējošās vai kaulu smadzeņu un citu reģionu mezglu izklidēto audzēja šūnu CTCs izmērā  $\leq 0.2\text{mm}$  nenoklasificē M1 stadiju, ja nav citi klīniskie un/vai radiogrāfiskie patoloģiski atradumi. Taču gadu gaitā pētījumi liecina par to, ka pat M0 stadijā atrodamas CTCs tiek asociētas ar audzēja atgriešanās risku un saīsinātas dzīvildzes prognozi. Līdz ar šo atklājumu, ir izvirzīts pieņēmums, ka histoloģiski redzami metastatiski atradumi, kas ir  $\leq 0.2\text{mm}$  kaulu smadzenēs vai citos orgānos, kas ir distāli no krūts vai reģionāliem limfmezgliem, vajadzētu tikt klīniski klasificēti kā M0(i+) apzīmējot to, ka tas netiek tehniski klasificēts kā metastatisks, taču tiek asociēts ar izteiktu dzīvildzes korelācijas samazinājumu, tāpat kā CTC skaits  $\leq 5$  (Badve 2018).

### 1.2.2 Krūts vēža klasifikācija

Pēdējo 20 gadu laikā ir klasificēti četri klīniskie subtipi, kas izvērtē ER, PR, Ki-67 un HER2 ekspresiju. Šāda klasifikācija tiek uzskatīta par galveno, klīnikā pašlaik pieejamo sistēmu pēc kuras tiek izvērtēta vēža terapija. Klīnikā šos marķierus nosaka izmantojot IHC (Prat et al. 2015):

1. **Luminal A (LumA):** ER+ un/vai PR+, HER2-, zems Ki-67 līmenis.
2. **Luminal B (LumB):** ER+ un/vai PR+, HER2+ vai augsts Ki-67 līmenis.
3. **HER2+:** ER-/PR-, HER2+.
4. **Trīskārtēji negatīvais krūts vēzis (TNBC) :** ER-/PR-/HER2-.

Molekulāri subtipus iedala pēc audzēju gēnu ekspresijas profiliem – izmantojot klasterēšanās analīzi. Krūts vēža klīniskie un instrinsic subtipi nesakrīt pat intra-tumorālā salīdzināšanas gadījumā, it īpaši Luminal B audzējos. Ir veikti ļoti maz pētījumi, kas censtos veicināt instrinsic un klīnisko subtipu vienotību (Milioli et al. 2016).

Intrinsic subtipus iedala pēc ER/PR/HER2 statusa un subtipam raksturīgiem ekspresējošiem gēniem (Eroles et al. 2012):

1. **Basal-like:** ER-; PR-; HER2-. *KRT5, CDH3, ID4, FABP7, KRT17, TRIM29.*
2. **HER2-enriched:** ER-; PR-; HER2+. *ERBB2, GRB7.*
3. **Normal breast-like:** ER+/-; HER2+. *PTN, CD36, FABP4, AQP7.*
4. **Luminal A:** ER+; PR+; HER2-. *ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, CCND1, LIV1.*
5. **Luminal B:** ER+/-; PR+/-; HER2-/+ . *ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, SQLE.*
6. **Claudin-low:** ER-; PR-; HER2-. *CD44, SNAI3.*

Luminal A no B galvenokārt var atšķirt RNS un proteīnu līmenī, skatoties šūnas cikla saistītiem un proliferācijas ietekmējošiem signālceļiem, kā arī hormonu ietekmējošiem signālceļiem un to ekspresētajiem gēniem. Luminal A audzēji sastāda 30-45% no visiem audzējiem un tie tiek asociēti ar vislabāko prognozi, lēnu progresiju kā arī ar zemāko atgriešanās risku (Voduc et al. 2010). Luminal B subtipa kategorijas audzēji, salīdzinājumā ar Luminal A, izpaužas ar augstāku šūnu proliferāciju un ekspresējās vairāk šūnas cikla ietekmējošie gēni vai proteīni, *MKI67* un *AURKA*, taču zemāk ekspresē progesterona receptori un *FOX1*. Luminal A audzējiem, salīdzinājumā pret Luminal B ir novērotas mazāks kopējo mutāciju skaits genomā, mazāks kopiju skaita variantu daudzums, mazāk *TP53* mutācijas (12% pret 29%, attiecīgi), vairāk *PIK3CA* mutācijas (45% pret 29%) un vairāk *MAP3K1* mutācijas (13% pret 5%).

*HER2-enriched* subtipu RNS un proteīnu līmenī raksturo HER2 un proliferāciju saistīto gēnu un proteīnu ekspresija (*GRB7* un *ERBB2/HER2*). HER2-enriched subtips DNS līmenī ir ar visaugstāko mutāciju skaitu genomā- tāds gēns kā *TP53* ir mutēts 72% un *PIK3CA* ir mutēts 39% gadījumos. Visos šī subtipa audzējos ir novērotas *APOBEC3B* gēna saistītās mutācijas ar augstu frekvenci, to izskaidrojot ar to, ka *APOBEC3B* ir *APOBEC* citidīna deamināzes grupā, kas pārvērš citozīnu par uracilu un tiek asociēts kā ierosinātājs daudziem audzējiem.

\* **Ki-67** – Proteīns, kas sastopams tikai audzēja šūnu kodola dalīšanās laikā un to nosaka procentuāli- cik daudz šūnās no biopsijas šīs proteīns ir atrasts. Tiek saukts par proliferācijas marķieri. Augsts Ki-67 rādītājs nosaka to, ka audzēja šūnas agresīvi proliferē un līdz ar to šādi audzēji ir izteikti agresīvāki un rezultējās ar sliktu klīnisko iznākumu. Lai gan rādītājs liecina par audzēja agresivitāti un pasliktina terapijas izredzes, audzēji ar augstu Ki-67 ir uzņēmīgi pret ķīmijterapiju HER2+ un ER- krūts vēža gadījumā (Kim et al. 2014). Ki-67 rādītājs, kas ir  $\leq 10\%$  tiek pieskaitīts pie zema riska kategorijas, 20-29% tiek pieskaitīts pie minimāla riska augstai audzēja proliferācijai, un  $\geq 30\%$  tiek pieskaitīts par augstas proliferācijas marķieri. Diapazons no 10-30% nenoraksturo konkrētu audzēja subtipu un tikai balstoties uz šo marķieri nevar iedalīt LumA/LumB kategorijās (Kim, Lee et al. 2014).

St. Gallen Internacionālajā 2013. gada krūts vēža konferencē tika definēti krūts vēža subtipi, kas sīkāk klasificēja luminālos audzējus balstoties uz sekojošajiem kritērijiem: Luminal A audzēji (ER+, HER2-, zema Ki-67 ekspresija ( $<20\%$ ) un augsts PR līmenis ( $\geq 20\%$ )); Luminal B HER2- (ER+, HER2-, augsta Ki-67 ekspresija ( $>20\%$ ) un zems PR līmenis ( $<20\%$ )); Luminal B HER2+ (ER+, HER2+, nav atkarīgs no Ki-67 ekspresijas vai PR līmeņa. Jau gadu vēlāk, piedāvātā klasifikācija tika uzskatīta par nepietiekamu, pamatojot to, ka pacienti ar Luminal A audzējiem, kuriem ir zema Ki-67 ekspresija un neatkarīgs PR līmenis vai vidējs Ki-67 un augsts PR ekspresijas līmenis rezultējās ar labāku klīnisko iznākumu, salīdzinājumā ar iepriekš pieņemto Luminal A audzēju klasifikāciju un ir nepieciešams vēl sīkāks sadalījums (Maisonneuve et al. 2014). Epiģenētiskie faktori arī ietekmē subtipu klasifikāciju, piemēram, DNS metilācija (Fang et al. 2011; Cornen et al. 2014). Luminal B audzējiem ir rasturīga palielināta DNS metilācija CpG salīnās un tā izraisa fenotipiskas izmaiņas, taču Luminal A audzējiem DNS metilācija ir izteikti heterogēna un ar mazāk novērotām metilācijas izraisītās izmaiņām, salīdzinājumā ar normāliem audiem (Holm et al. 2010; Stefansson et al. 2015).

### 1.3 Krūts vēža ģenētika

Tikai 5-10% krūts vēža gadījumi ir iedzimti, taču šis skaits variē atkarībā no valsts un cilvēku etniskās piederības. Analizējot cilvēku grupas, dažkārt ir iespējams noteikt mutācijas klātbūtni pirms audzējs attīstās un rezultējās ar smagām sekām. Lielbritānijā veiktā pētījumā, kurā tika iesaistītas 113 000 sievietes ar vienu pirmās pakāpes radnieku ar krūts vēzi tika parādīts, ka šīm sievietēm krūts vēža veidošanās risks ir 1.75 reizes lielāks nekā sievietei bez krūts vēža ģimenes vēsturē. Ja sievietei bija divi vai vairāk pirmās pakāpes radnieki ar krūts vēzi risks ir palielināts 2.5 reizes, saistot to ar iedzimtām mutācijām tādos gēnos kā *BRCA1* un *BRCA2* (Brewer, Jones et al. 2017). Krūts vēža mutācijas iedala iedzimtajās un somatiskajās mutācijās.

Divas, augstas penetrances audzēja supersorgēnu mutācijas *BRCA1*(17q21) un *BRCA2*(13q13). Šo gēnu proteīni ir iesaistīti DNS labošanas mehānismā un to mutācijas tiek asociētas ar uzkrājošo risku – risku, kas palielinās ar vecumu. No visiem jauni diagnosticētiem gadījumiem 50% sastāda sievietes vecuma grupā virs 65 gadiem un 30% virs 70 gadiem (Elomrani et al. 2015). Lai gan krūts vēzis vīriešiem vidējā populācijā ir sastopams mazāk nekā 1%, vīriešiem ar noteiktām *BRCA2* gēna mutācijām risks ir aptuveni 7% un tas ievērojami palielina vēža veidošanās riska nodošanu nākamajai paaudzei, neatkarīgi no dzimuma. *BRCA1/2* mutācijas izraisa arī olnīcu vēža riska palielināšanos no populācijas vidējā ~2% sastopamības riska uz 27-44%, tas pats novērojams prostatas vēzim no 7-15% uz aptuveni 40% un aizkuņģa dziedzera risku no ~1% uz 2-4% (Anonymous 2018). Krūts vēža mutāciju noteikšana rada problēmas diagnostisko testu izstrādē, jo pat visbiežāk sastopamās somatiskās mutācijas nebūs sastopamas katrā vēža pacienta gadījumā. Visbiežāk sastopamo mutāciju desmitniekā ir sekojošo gēnu mutācijas - *PIK3CA*, *TP53*, *MUC16*, *GATA3*, *TTN*, *CDH1*, *KMT2C*, *MAP3K1*, *SYNE*, *AHNAK2* (Naito and Urasaki 2018).

**(1) *CDH1*** gēns atrodas 16. hromosomā – 22.1 pozīcijā (16q22.1). Gēns kodē e-kadherīna sintēzi. E-kadherīns ir glikoproteīns un adhēzijas molekula, kura ir svarīga šūnu un audu struktūru, kā arī epitēlija audu funkciju saglabāšanā. Tas tiek pieskaitīts arī kā audzēja supresors krūts vēža gadījumā (Bex and van Roy 2009). E-kadherīnu iedala trīs domēnos – Ārpusšūnas domēns, transmembrānas domēns un citoplazmas domēns. Citoplazmas domēns mijiedarbojas ar beta-katenīnu un p120-katenīnu. Beta-katenīns saistās ar alfa-katenīnu un palīdz e-kadherīnam piesaistīties aktīva citoskeletam. Mutācija *CDH1* gēnā rezultējās ar nefunkcionāla, zemas adhēzijas aktivitātes e-kadherīna

produkciju. **(2) *PIK3CA*** gēns atrodas 3. hromosomā – 26.32 pozīcijā (3q26.32). Gēns kodē proteīnu PIK3 katalītisko subvienību alfa ( $p110\alpha$ ). Tā mutācijas tiek atrastas katram trešajam krūts vēža pacientam, tiek asociētas ar dažādiem ģenētiskajiem sindromiem kā arī ar citiem onkoloģiskiem veidojumiem- urīnpūšļa, plaušu un olnīcu vēzi, kā arī tiek asociētas galvenokārt ar lumināliem un HER2+ audzējiem. Tā signālceļu aktivāciju novēro aptuveni 70% no visiem krūts vēža gadījumiem, bet tā mutācijas ir novērotas aptuveni 20-30% krūts vēža pacientu. Visbiežākie *PIK3CA* gēna mutāciju ‘karstie punkti’ ir eksona 9 E542K, G1624A, E545K un G1633A, kā arī eksona 20 H1047R un A3140G, kopā sastādot 70-80% no visām *PIK3CA* mutācijām (Shimoi et al. 2018). **(3) *TP53*** gēns kodē tumor-supresoru proteīnu, kā mutētās allēles izraisa augstu krūts vēža riska pieaugumu, kas līdzinās *BRCA1* mutācijām. Gēns atrodas 17.hromosomā 13.1 pozīcijā (17q13.1). Tam ir atrasta cieša saikne ar retinoblastomas proteīna 1 (*RB1*) signālceļu. *TP53* tiek saistīts ar šūnas cikla izmaiņām, šūnu labošanas procesu un apoptozes izraisīšanu. Mutācijas gēnā tiek asociētas ar krūts audzēju progresiju. Atrasta ir iespējama saikne ar sporādisku krūts vēzi, kas padara šo gēnu par izcilu kandidātu gēnu mutāciju paneļa analīzē, veicot diagnostiku vai prognozējot audzēja klīnisko gaitu (Manie et al. 2009). Viena nukleotīda izmaiņas *TP53* gēnā no CGC uz CAC eksona 10 kodonā 337 izmaina aminoskābes no arginīna uz histidīnu, rezultējoties ar kodona nomainas mutāciju, ko asociē ar agrīna krūts vēža veidošanos (Smith et al. 2011; Rath et al. 2013). Šī mutācija ir tikai viens no piemēriem, ka *TP53* aminoskābju ietekmējošās mutācijas spēj palielināt audzēja risku. **(4) *GATA3*** gēns atrodas 10. hromosomā – 14. pozīcijā (10p14). Tas kodē *GATA3* transkripcijas faktoru, kas kontrolē daudzu bioloģiski nozīmīgu gēnu ekspresiju. Tā darbība ir saistīta ar *FoxA1* un estrogēna receptoru  $\alpha$ . *GATA3* mutāciju gadījumā samazinās *GATA3* ekspresija, samazinot ER ekspresiju, auto-regulējot viens otra ekspresiju. Šī sakarība tiek pamatota ar augsto *GATA3* un ER ekspresijas korelāciju LumA audzēju gadījumos, līdz ar to *GATA3* kontrolējot ER ekspresiju ir nozīmīgs estradiola-stimulētā ER+ krūts vēža progresijā. Visaugstākā *GATA3* un ar to saistīt ER ekspresija tiek novērota LumA audzējos, mazāk LumB audzējos un vismazāk bazālajos audzējos. Lielāka daļa no *GATA3* mutācijām ir insercijas/delēcijas, tās ir noteiktas 5. un 6. eksonā, ietekmējot kodējošos reģionus un rezultējoties ar kodējošā proteīna trunkāciju un funkcionalitātes zudumu (Takaku et al. 2018). **(5) *MUC16*** gēns atrodas 19. hromosomā – 13.2 pozīcijā (19p13.2). Gēns kodē vēža antigēnu 125 jeb mucīnu 16. Tas tiek uzskatīts par biomarķieri olnīcu vēža gadījumā, taču tā mutācijas ir atrastas arī krūts, plaušu un aizkuņģa dziedzera vēža gadījumā. Gēna kodētais proteīns piedalās epitēlija aizsargmehānisma nodrošināšanā kā arī tas pasargā organismu no karcinogēnēzes. Lai gan *MUC16* mutāciju rezultātā netiek

tieši inducēta karcinogēnēze, taču kombinācijā ar p53 mutāciju, tā var tikt iniciēta (Aithal et al. 2018). **(6) TTN** gēns jeb titīns atrodas 2. hromosomā – 31.2 pozīcijā (2q31.2). Ar to asociē 63 aminoskābju ietekmējošas un 13 aminoskābju neietekmējošas mutācijas, kas tiek saistītas ar audzēju veidošanos aknu, krūts, plakanšūnu un krūts vēža gadījumā (Lawrence et al. 2013; Deng et al. 2019).

Ārpus visbiežāk sastopamajām gēnu mutācijām, krūts vēzim ir atrasta asociācija arī ar daudz retāk sastopamām mutācijām gēnos *CHEK2*, *RAD50/51*, *ERBB2*, *NBS1*, *BRIP1* un *PALB2*, pamatojot to ar sekojošu mutāciju nozīmi krūts vēža veidošanās procesā: **(1) CHEK2** gēns atrodas 22. hromosomā - 12.1 pozīcijā (22q12.1). Šis gēns producē 'kontrolpunkta kināzes 2 proteīnu', kas funkcionē kā tumor-supresors. Ir novērota arī šī gēna sadarbība ar BRCA1 (Lee et al. 2000). Proteīna aktivācija notiek momentā, kad noris DNS pārrāvums vai bojājums, rezultējoties ar šūnas dalīšanās apstādinašanu, ko veic kopā ar TP53 un citiem proteīniem. Ja šūna neizdzīvo DNS labojumus tad sākās šūnas apoptoze (Chehab et al. 2000). CHEK2 mutācija 1100delC izraisa saīsinātu, nefunkcionālu CHEK2 proteīna produkciju, ietekmējot šūnas cikla kontrolpunkta darbību un šūnas labošanu. **(2) RAD50** gēns atrodas 5. hromosomā – 31.1 pozīcijā (5q31.1). DNS labošanas procesā, RAD50 proteīns satur bojāto ķēdi, kopā ar *MRE11A* un *NBN* gēnu proteīniem. Mutācija gēnā rezultējās ar saīsinātu un nefunkcionālu RAD50 proteīna sintēzi. **RAD51** gēns atrodas 5.hromosomā – 15.1 pozīcijā (15q15.1). Līdzīgi kā *CHEK2* gadījumā, gēna proteīns ir iesaistīts DNS labošanas procesā, taču RAD51 proteīnu uz bojāto ķēdi kodolā transportē BRCA2 proteīns. Labošana notiek kopā ar BRCA1/2 un PALB2 proteīnu līdzdalību (Buisson et al. 2010). **(3) EGFR un ERBB2**. *ERBB2* gēns (Her-2/neu, v-erb-b2 putnu eritroblastiskā leukēmijas vīrusa onkogēna homologs 2) atrodas 17. hromosomā – 12 pozīcijā (17q12). *ERBB2* pieder pie epidermālā augšanas faktora receptoru grupas. *ERBB2* kodē ErbB2 augšanas faktora receptora proteīnu, kas atrodas uz šūnu virsmas un spēj saistīties ar līdzīgiem receptoriem. Šis proteīns piedalās šūnu adhēzijā un mobilitātē (Olayioye 2001). Liekas gēna kopijas izpaužas palielinātā ErbB2 receptora proteīna ekspresijā uz šūnas virsmas un rezultējās ar nebeidzamu signālu sūtīšanu šūnām strauji augt un dalīties, kas noved pie audzēju veidošanās. Līdz ar to, palielināta ErbB2 gēna ekspresija tiek asociēta ar palielinātu krūts vēža metastāzējošu audzēju risku (Emens 2005). EGFR amplifikācija ir noteikta tikai 6% no krūts vēža pacientiem, Rietumu valstīs veiktos pētījumos dati liecina par to, ka 7-36% no visiem krūts vēža pacientiem ir atrodama EGFR ekspresija, padarot to par vienu no visbiežāk sastopamajiem krūts vēža marķieriem (Lynch et al. 2004). EGFR ekspresija tiek asociēta arī ar rases atšķirībām vai etnisku predispozīciju, jo pētījumā, kas veikts Saudu Arābijā, šī proteīna ekspresija tika novērota

tikai 1.3% krūts vēža pacientiem (Shawarby et al. 2011). **(4) *PALB2*** gēns atrodas 16. hromosomā – 12.2 pozīcijā (16p12.2). Tas kodē proteīnu, kas ir BRCA2 ko-proteīns. Proteīns darbojas kopā ar BRCA2, lai labotu bojātus DNS pavedienus un novērš mutāciju uzkrāšanos šūnās. Mutācijas *PALB2* gēnā rezultējās ar aptuveni divkārtu krūts vēža riska palielināšanos (Casadei et al. 2011). Ir noteiktas desmit dažādas *PALB2* gēna mutācijas, kas izpaužas ar netipiski īsa *PALB2* proteīna sintēzi, kas kopā ar BRCA2 nespēj efektīvi labot DNS fragmentus (Rahman et al. 2007). **(5) *BRIP1*** gēns atrodas 17. hromosomā – 23.2 pozīcijā (17q23.2). Gēna kodētais proteīns atbilst par DNS pavedienu labošanu kodolā, darbojoties kopā ar BRCA1. *BRIP1* proteīnam piemīt helikāzes darbības princips, jo tas piesaistās pie DNS fragmenta bojātajā lokācijā un īslaicīgi atdala abus pavedienus, ļaujot BRCA1 sasniegt bojāto pavedienu un salabot to. Tā loma ir saglabāt šūnas ģenētiskās informācijas stabilitāti, kas padara šo gēnu par tumor-supresoru. Iedzimtas mutācijas šajā gēnā un nelielas izmaiņas gēna nukleotīdā ir saistītas ar krūts vēža riska palielināšanos (Song et al. 2007; Pabalan et al. 2013). Gēna mutācija noved pie saīsināta un nefunkcionāla proteīna sintēzes, kas nespēj efektīvi atdalīt pavedienus un liedz BRCA1 labot bojātos DNS fragmentus.

Pastāv daudzi ģenētiski sindromi, kuriem ir atrasta asociācija ar krūts vēzi, piemēram *Li Fraumeni* sindroms; *Crowden* sindroms; Difūzais kuņģa vēzis un *Peutz-Jeghers* sindroms. (1) *Li Fraumeni* sindromu raksturo mutācija *P53* gēnā un šis sindroms palielina krūts vēža veidošanās risku līdz 50-80%, sasniedzot 45 gadu vecumu. Taču šis sindroms nav saistīts tikai ar krūts vēža riska palielināšanos – Tas ir asociēts arī ar sarkomu, limfomu, akūtas leukēmijas, virsnieru dziedzeru audēju, kā arī ar smadzeņu audzēju veidošanos (Nandikolla et al. 2017). (2) *Crowden* sindromu raksturo mutācija *PTEN* gēnā un šis sindroms palielina krūts vēža veidošanās risku visas dzīves laikā par aptuveni 20-50%. Lai gan visbiežāk šis sindroms tiek asociēts arī ar labdabīgiem veidojumiem, piemēram hamartomām, tas tiek saistīts arī ar dzemdes kakla vēzi kā arī makrocefāliju un vairogdziedzera slimībām (Kimura et al. 2017). (3) Difūzo kuņģa vēzi raksturo mutācija e-kadherīna *CDH1* gēnā un visbiežāk tas tiek asociēts ar kuņģa vēzi, taču ir novērota asociācija, ka cilvēkiem ar šo vēzi ir par 39% palielināts krūts vēža risks, ko var skaidrot ar šūnu adhēzijas molekulu trūkumu, jo audzēji ir pārsvarā lobulāri un veido vēža šūnu ķēdes, ne viendabīgus audzējus (Pharoah et al. 2001). (4) *Peutz-Jeghers* sindromu raksturo mutācija *STK11* gēnā un to saista ar hiperpigmentāciju mutes dobuma gļotādā, kā arī ar gremošanas trakta polipu veidošanos, taču pacientiem ar šo sindromu 60 gadu vecumā ir noteikts palielināts krūts vēža risks par aptuveni 32% (Hearle et al. 2006).

Ir novērota augsta korelācija *BRCA1/2* mutācijām ar krūts vēža veidošanās risku, tāpēc, piemēram, ASV klīnikās diagnostiku veic atbilstoši *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) vadlīnijām tiem pacientiem, kuri atbilst sekojošiem kritērijiem (Anonymous 2019):

- a) Pacientiem, kuriem kādam no ģenētiski tuviem asinsradiniekiem ir atklāta mutācija vienā no šiem gēniem;
- b) Pacientiem, kuriem ir diagnosticēts krūts vēzis vecuma grupā zem 45-50 gadiem;
- c) Pacientiem, kuriem ir diagnosticēts bilaterāls krūts vēzis vecuma grupā zem 50 gadiem;
- d) Pacientiem, kuriem ir diagnosticēts trīskārt negatīvais krūts vēzis vecuma grupā zem 60 gadiem.
- e) Aškenazi ebrejiem, kuriem ir diagnosticēts krūts vēzis, jebkurā vecuma grupā kā arī tiem, kuriem ir viens pirmās pakāpes radnieks ar krūts vai olnīcu vēzi vai divi otrās pakāpes radnieki ar krūts vai olnīcu vēzi. ASV reģionā, ja sievietei ir atrasta *BRCA* mutācija, vecuma grupā līdz 70 gadiem, 50% saskarsies ar krūts vēzi, salīdzinājumā ar 7%, kas raksturīgs vidējai populācijai. Tāpat 30%, vecuma grupā līdz 70 gadiem, saskarsies ar olnīcu vēzi, ja ir noteikta *BRCA* mutācija, salīdzinājumā ar vidējās populācijas 1% riska grupu (Anonymous 2017). Ebreju tautības cilvēkiem ir ievērojami palielināts krūts vēža veidošanās risks, ja atrodama kāda no *BRCA* mutācijām;
- f) Pacientēm, kuriem ir diagnosticēts olnīcu vēzis, jebkurā vecuma grupā, jo mutācijas klātbūtne iespējams palielina arī krūts vēža veidošanās risku;
- g) Vīriešiem, kuriem ir diagnosticēts krūts vēzis (Anonymous 2019).

Sievietēm, kurām tiek atrastas *BRCA1/2* mutācijas ir 45-65% lielāks risks saslimt ar krūts vēzi līdz 70 gadu vecumam. Mutāciju atklāšanas gadījumā tiek piedāvāts regulāri veikt mamogrāfiju, ultrasonogrāfiju vai pat magnētisko rezonansi. Tiek piedāvāta arī opcija veikt pilnu dubulto mastektomiju, taču šāda ķirurģiska iejaukšanās samazina krūts vēža risku par aptuveni 90-95% un neizslēdz audzēja veidošanos audos, kas palikuši pie krūšu kurvja priekšējās sienas (Anonymous 2018).

Pareiza pacienta audzēja klasifikācija, piemērota un pareiza diagnostika kā arī pareiza rezultātu interpretācija būtiski ietekmē terapijas izvēli un gaitu.

## 1.4 Krūts vēža diagnostika

Agrīna krūts vēža diagnostika ir ļoti nozīmīga un sniedz iespēju laicīgi sākt terapiju, kas sniedz vislabāko izdzīvošanas iespējamību. Mūsdienās, daudzi atsakās pārbaudīt savu veselību līdz pēdējam brīdim, noveļot vainu uz ekonomiskiem faktoriem, laika trūkumu vai noliedzot problēmu esamību. Diagnostika tiek veikta novēloti, kad audzējs ir neoperējamā stadijā vai jau sācis metastāzēt. Pacientam ierodoties pie ārsta ar sūdzībām par audzēja izraisītām sekām tiek noteikta paliatīvā aprūpe, jo dzīvildze vēlās audzēja stadijās ir ievērojami saīsināta. Agrīna audzēja stadijas atklāšana ir svarīga pacientu dzīvības glābšanai, līdz ar to ir nepieciešama precīzu skrīninga metožu pilnveidošana vai kombinēšana, izslēdzot pēc iespējas vairāk viltus pozitīvos un viltus negatīvos gadījumus.

### 1.4.1 Agrīnā diagnostika

Visbiežāk krūts vēzis tiek atklāts pēc pacienta simptomu izpausmes, taču daudzām sievietēm ar krūts vēzi simptomi vispārīgi neizpaužas, līdz audzējs ir attīstījies līdz vēlīnai stadijai. Sākotnējo, profilaktisko skrīningu veic izmantojot mamogrāfiju ar papildinājumu – ultrasonogrāfiju, pēc vajadzības. Ja ir radušās aizdomas par krūts vēzi, var tikt pielietotas specifiskākas metodes, kas ļauj detektēt daudz mazākus audzējus. Ja krūts vēzis tiek atrasts, tad visbiežāk tiek veikta tā izvērtēšana ņemot biopsiju, atkarībā no audzēja izmēra. Audzējs tiek izvērtēts pēc TNM sistēmas un ja ir aizdomas par to, ka audzējs ir ļaundabīgs un tas ir operējams, tiek veikta operācija, visbiežāk mastektomija, taču mūsdienās tiek piedāvātas arī alternatīvas metodes, piemēram krūts saglabāšanas operācija. Visbiežāk, tiek veikta arī *BRCA* mutāciju testēšana, ja pacients atbilst vadlīniju kritērijiem un attiecīgi pēc rezultātiem tiek izvērtēta sekojošās ķirurģiskās iespējas, kā arī ķīmijterapijas pielietošana ar iespēju pielietot arī hormonālo terapiju.

Lai laicīgi noteiktu krūts vēzi agrīnās stadijās, klīniskajā praksē tiek pielietotas piecas krūts vēža skrīninga un attēldiagnostikas metodes:

- a) **Mamogrāfija**- Krūts mamogrāfijas veic reizi gadā vai reizi divos gados par valsts kompensētiem līdzekļiem. Izmeklējuma metodes jutīgums ir atkarīgs galvenokārt no pacienta vecuma, etniskās piederības un slimības vēstures, taču tas var būt atkarīgs arī no ārsta pieredzes un iekārtas kvalitātes. Pie metodes trūkumiem tiek pieskaitīts fakts, ka diagnostika ir apgrūtināta pirms menopauzes vecuma sievietēm un sievietēm ar blīviem krūšu audiem, rezultējoties ar augstu viltus pozitīvo un viltus negatīvo rezultātu skaitu, kā arī tas, ka metodē tiek pielietota jonizētā

radiācija. Blīvi krūšu audi veido noēnojumu, kas apgrūtina iegūto attēlu interpretāciju. Mamogrāfijas pielietojums samazināja krūts vēža nāves gadījumu skaitu tikai par 0.0004%, kas ievērojami mazāk par to, kas ticis prognozēts pirms tam (Smart 1997). Pēdējos gados kā papildinājums tiek pielietota kontrasta (CE) digitālā mamogrāfija. Radiogrāfiskās krāsas injekcija vēl vairāk palielina radiācijas devu, ko pacients saņemtu standarta mamogrāfijas apstākļos, taču sniedz daudz augstākas precizitātes rezultātus, salīdzinājumā ar ultrasonogrāfiju vai parasto mamogrāfiju (Lobbess et al. 2013). Metode ir ļoti ātra, jo attēlu var iegūt pāris sekunžu laikā. Metodes jutība ir ~85% un specifiskums ir ~95.0%.

- b) **Ultrasonogrāfija**- Krūšu ultrasonogrāfija, lai gan ar mazāku precizitāti salīdzinājumā ar mamogrāfiju, ir ekonomiski visizdevīgākais skrīninga veids, ar ko audzējus var atpazīt pēc akustisko viļņu atstarošanās pret krūts audiem, dodot iespēju noteikt cistas un cietus veidojumus. Šo metodi iesaka pacientu grupām, kurām ģenētiski ir noteikta predispozīcija uz krūts vēzi vai tiem, kuriem ir krūts vēzis diagnosticēts kādam no ģimenes locekļiem, taču bieži to izmanto kā papildinājumu, lai precīzāk noraksturotu mamogrāfijā atrastus veidojumus. Izmeklējuma veikšana aizņem aptuveni 10-20 minūtes. Metodes jutība ir ~83.0%, taču specifiskums ir tikai ~34.0%, līdz ar to tiek iegūts sliktas izšķirtspējas attēls.
- c) **Magnētiskā rezonanse (MRI)**- Tiek veikta izmantojot spēcīgu magnētisko lauku, kas kombinācijā ar radio frekvences signāliem veido slāņveida attēlus. Metodi uzlabo kontrastvielas pielietojums. MRI pārsvarā pielieto jaunām pacientēm, kurām ir augsta krūts vēža predispozīcija, taču nav ieteicams to veikt visām sievietēm dēļ augstām izmeklējuma izmaksām, metodes laika patēriņa (40-60 minūtes) un tā, ka šī metode sniedz daudz viltus pozitīvus rezultātus. Parasti iesaka veikt kombinācijā ar mamogrāfiju pacientēm, kurām ir noteiktas BRCA mutācijas un kuras ir augstā krūts vēža riska grupā. Metodes jutība ir ~94.4%, kas ir daudz augstāks par ultrasonogrāfiju un mamogrāfiju, atļaujot diagnosticēt mazāka izmēra audzējus, taču izmeklējuma specifiskums ir ļoti zems ~26.4%.
- d) **Datortomogrāfija (CT)**- Metodi veic ar iekārtu, kas ar rentgenstaru palīdzību iegūst slāņainus orgānu 2D attēlus un to salikums ļauj iegūt priekšstatu par audzēju atrašanās vietu un izmēru. Ar CT ir iespējams atrast ļoti maza izmēra audzējus, kurus citādi ar mamogrāfiju vai fiziskā izmeklējuma laikā nav iespējams atrast. Metode ir dārga un pacientu pakļauj radiācijai, taču ilgst tikai aptuveni piecas minūtes. Jutība ir ~91.0% un specifiskums ir ~93.0%.

- e) **Protonu emisijas datortomogrāfija (PET)**-. Pozitronu emisijas tomogrāfija tiek veikta izmantojot kontrastvielu, kas ir pievienota glikozei. Šo cukuru ar kontrastvielu audzēja šūnas uzņems ātrāk un vairāk, tādējādi vizualizējot kontrastu starp audzēja un veselajiem audiem. Ar šo izmeklējumu var veikt bioloģisko procesu novērošanu, lai atrastu metastāzes un izpētītu atbildes reakciju uz terapiju. Metodi neizmanto, lai agrīni atklātu krūts audzēju, bet pēc atklāšanas vai izmantot kā papildus metodi, kas atļauj atrast maza izmēra audzējus. Pacients tiek pakļauts jonizētai radioaktivitātei un saskarās ar radioaktīvu kontrastvielu. Metodes ilgums 90-240 minūtes, jutība ~61.0% un specifiskums ir ~80.0%.

Tiek piedāvātas alternatīvas krūts vēža diagnostiskas metodes, kuras vēl tiek pārbaudītas klīniskos apstākļos un ir pieskaitītas eksperimentālai grupai, kas pielieto mikroviļņu vizualizācijas metodes (MI). Mikroviļņu krūts diagnostiku var iedalīt aktīvajā un pasīvajā pieejā, taču aktīvo iedala vēl divās grupās – Mikroviļņu tomogrāfija un radara MI. Pasīvajās MI tiek izmantota radiometrija, lai izmērītu temperatūras atšķirību starp normāliem un ļaundabīgiem audiem. Aktīvajā MI tiek izmantotas dielektriskās īpašības, kas atļauj noteikt starpību starp veseliem un ļaundabīgiem audiem.

Krūts vēža biopsijas iedala 3 kategorijās:

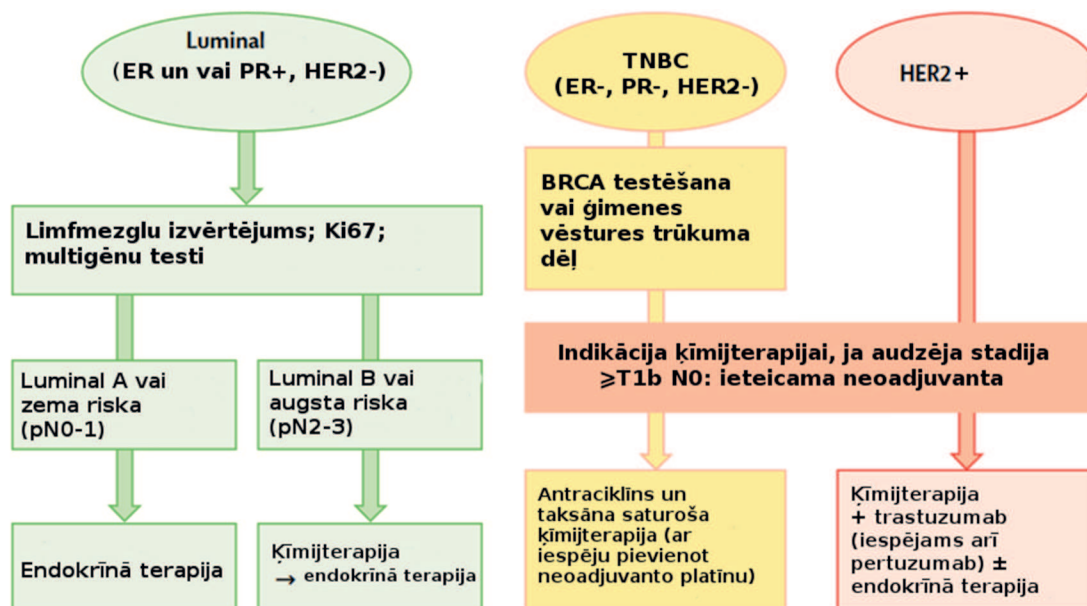
- a) Ekscīzijas biopsija: Audu vai veselu veidojumu izgriešana.
- b) *Core* biopsija: Audu parauga paņemšana, izmantojot plata diametra adatu (1.27-1.83mm)
- c) Tievās adatas aspirācijas (FNA) biopsija: Audu vai šķidrums parauga paņemšana, izmantojot šaura diametra adatu (0.52-0.64mm). Metodi visbiežāk veic kombinācijā ar ultrasonogrāfiju.

Krūts vēža skrīningu veic izmantojot FNA biopsiju, kurā visbiežāk tiek paņemtas šūnas vai šķidrums. Ja nepieciešams apstiprināt diagnozi, tiek pielietota maza audu gabala, jeb *core* biopsija. Ekscīzijas biopsija tiek veikta lai apstiprinātu biopsiju, izgriežot skartos audus vai limfmezglus, kas atšķirās no *core* biopsijas lielākoties ar paņemto audu parauga izmēru (Badve 2018).

## 1.5 Krūts vēža terapija

Krūts vēža terapiju galvenokārt iedala vairākās kategorijās – Endokrīna / hormonālā terapija, sistēmiskā ķīmijterapija, imūnā terapija / bioloģiskā terapija, ķirurģija, radiācijas terapija un molekulāri mērķētās zāles.

Klīniskajā praksē, krūts vēža terapijas izvēle pašlaik balstās uz molekulārajiem subtipiem. Tā kā Luminal A audzēji ir ER/PR+ un HER2- to pirmā izvēle ir hormonālā terapija, ko pēc vajadzības var kombinēt ar ķīmijterapiju. Luminal B audzēji ir ER/PR+ un HER2+, tāpēc to pirmās izvēles terapija ir hormonālā terapija, pēc vajadzības pievienojot arī ķīmijterapiju. HER2 audzēji ir ER/PR- un HER2+, tāpēc hormonālā terapija nelīdzēs, taču pirmā izvēle būtu HER2 mērķētā terapija, pievienojot ķīmijterapiju pēc izvēles. Trīskārtēji negatīvie, jeb bazālie audzēji ir ER/PR/HER2-, tāpēc hormonālās un HER2 mērķētās terapijas pielietošana nav iespējama. Vienīgā izvēle ir sistēmiskā ķīmijterapija. Problēmu sagādā izšķirt Luminal A no Luminal B audzējiem, ko pārsvarā veic balstoties uz proliferācijas marķieri Ki-67 (Harbeck and Gnant 2017). Kad klasifikācija tiek veikta, Luminal A audzējus un zema riska kategorijas audzējus ārstē pārsvarā izmantojot endokrīno terapiju. Luminal B audzējus un augsta riska, kuri ir augsta riska kategorijas audzējus sākotnēji ārstē ar ķīmijterapiju, kam seko endokrīnā terapija. Trīskārtēji negatīvos audzējus sākotnēji testē uz *BRCA* mutācijām un *BRCA* mutāciju rezultātā visbiežāk pacientiem tiek pielāgota neoadjuvanta ķīmijterapija un adjuvanta ķīmijterapija (antraciklīns un taksāna-saturoša ķīmijterapija). Aptuveni 70% gadījumos, kad pacientam tiek atrasta iedzimta *BRCA1* mutācija, tas tiek atklāts TNBC gadījumā (Chen et al. 2018). HER2 pozitīvos audzējus var ārstēt ar sistēmisko ķīmijterapiju vai ar HER2 mērķēto terapiju. Visbiežāk tos ārstē ar neoadjuvanto ķīmijterapiju, kam seko ķīmijterapija, kombinācijā ar trastuzumab/pertuzumab un iespējams pievieno arī endokrīno terapiju (7. attēls) (Harbeck and Gnant 2017).



7. attēls –Terapijas vadlīnijas agrīna krūts vēža ārstēšanā. Attēls pielāgots balstoties uz (Harbeck and Gnant 2017).

Figure 7 – Guidelines for early breast cancer therapy. Image was adapted based on (Harbeck and Gnant 2017).

### 1.5.1 Ķīmijterapija un hormonālā terapija

Ķīmijterapija krūts vēža kontekstā ir farmakoloģisko vai dabisko līdzekļu pielietošana, kuriem piemīt spēj inhibēt krūts vēža progresiju (Sporn 1976). Aptuveni 70% no visiem krūts vēža gadījumiem ir ER+. Visbiežāk sistēmisko ķīmijterapiju kombinē ar hormonālo terapiju, ja tas ir iespējams receptoru pozitīvu audzēju gadījumos. Divas galvenās hormonu terapijas medikamentu klases, kas tiek pielietotas ER+ krūts vēža gadījumā kā anti-estrogēna medikamenti ir selektīvie estrogēna receptoru modulatori (SERM) un aromatāzes inhibitori (AI). (1) SERM grupas savienojumi darbojas kā estrogēna receptora agonisti vai antagonisti. Visbiežāk pielietotais SERM grupas medikaments ir tamoksifēns (TAM). Tā kā šo medikamentu lieto vairāk kā 30 gadus, tas ir visbiežāk pielietotais medikaments krūts vēža ārstēšanā. Vairāki, lielapjoma pētījumi ir parādījuši, ka TAM var pielietot gan invazīva, gan ne-invazīva krūts vēža riska samazināšanā. Lielākā daļa no šiem pētījumiem pierāda >30% ER+ krūts vēža gadījumu samazināšanos piecu gadu periodā, pielietojot TAM, taču ER- gadījumā šāds efekts nav novērots, hormonālās adjuvantās terapijas rezultātā (Cuzick et al. 2003; Cuzick et al. 2013). TAM terapijai ir tādi ievērojami blakus efekti kā endometrija vēzis, insults, trombembolija un dziļo vēnu tromboze, kuri visbiežāk izpaužas sievietēm vecuma grupa >50 gadiem, tāpēc TAM pielietošana kā pirmās izvēles terapija krūts vēža gadījumā var nebūt piemērota

visiem pacientiem un ir nepieciešams individuāls izvērtējums potenciālam terapeitiskam ieguvumam pret toksicitāti (Yang et al. 2017). Otrās paaudzes SERM medikaments ir raloksifēns, kuram ir mazāk negatīvās blakus parādības un to pielieto invazīva krūts vēža ārstēšanā sievietēm pēc menopauzes vecumā, kā arī sirds slimību un osteoporozes ārstēšanā. Ir pierādīts, ka šī medikamenta pielietošana DCIS un lobulāras karcinomas *in situ* (LCIS) gadījumā nav efektīva (Barrett-Connor et al. 2006). Raloksifēns, lai gan ar mazāk blakus parādībām, ir mazāk efektīvs par TAM krūts vēža terapijā, taču ņemot vērā samazināto endometrija vēža un trombembolijas risku, raloksifēns ir laba opcija invazīva audzēja ārstēšanā. Pie trešās paaudzes SERM medikamentu grupas pieskaita ospemifēnu, arzoksifēnu, lasofoksifēnu un bazedoksifēnu, taču bazedoksifēns vienīgais medikaments, kas ir izgājis pirms-klīnisko pētījumu stadiju (Calaf Alsina and Coronado Martin 2013).

Pēc-menopauzes vecuma sievietēm pirmās izvēles medikaments krūts vēža terapijā ir AI, aizvietojojam TAM. Pielietojot AI tiek samazināts asins plazmā esošais estrogēns, inhibējot aromatāzi – enzīmu, kas katalizē estrogēna biosintēzi no androgēna (Hiscox et al. 2009). AI iedala divās medikamentu grupās – Steroīdie inhibitori un ne-steroīdie inhibitori. Ne-Steroīdie inhibitori spēj piesaistīties pie enzīma aktīvas vietas un neatgriezeniski to pārveidot. Pie ne-steroīdās grupas pieder trešās paaudzes medikamenti kā anastrozols un letrozols, taču pie steroīdiem inhibitoriem pieskaita eksemestānu. Sievietēm ar agrīnu ER+ krūts vēzi, 10 gadu ATAC klīniskajā pētījumā tika parādīts, ka anastrozolam ir mazāk un vieglāki blakus efekti nekā TAM, kopumā liecinot, ka AI monoterapijas pielietošana ir efektīvāka samazinot krūts vēža gadījumu sastopamību, salīdzinājumā ar divu līdz trīs gadu terapiju ar TAM (Arimidex et al. 2008; Cuzick et al. 2010; Dubsky et al. 2012). Galvenais blakus efekts AI pielietošanā ir osteoporozes riska palielināšanās, kas skar daudz sievietes vecuma grupā >50 gadiem, taču blakus parādības var izpausties arī kā locītavu sāpes, karpālā kanāla sindroms vai lipīdu metabolisma izmaiņas, kas ir mazāk veselību vai dzīvību ietekmējoši blakus efekti salīdzinot ar TAM blakus parādībām. Pielietošanu galvenokārt ierobežo fakts, ka šī medikamenta pielietošana ir limitēta pēc-menopauzes vecuma sievietēm.

### 1.5.2 Imūnterapija

Bioloģiskā, jeb imūnā terapija ir terapijas apakšgrupa, kura iekļauj krūts vēža pacientu dzīves kvalitātes uzlabošanu, mērķējot vēža šūnas vai imūnšūnas. Aktīvā imūnterapija veicina imūno sistēmu nonāvēt audzēja šūnas, mērķējot audzēja antigēnus, taču pasīvā imūnterapija pastiprina eksistējošas pret-audzēja atbildes un iekļauj

monoklonālo antivielu, limfocītu vai citokīnu pielietošanu. Monoklonālo antivielu terapiju pārsvarā izmanto HER2+ audzēju gadījumā. Aptuveni 20-30% no visiem audzējiem tiek atrasta HER2 proteīna palielināta ekspresija vai *HER2* amplifikācija. Pirmā anti-HER2 viela, kas tika pielietota HER2+ krūts vēža ārstēšanā bija Trastuzumabs (Herceptīns), kas ir rekombinanta humanizēta monoklonālā anti-HER2 viela. Tā spēj tieši piesaistīties HER2 ārpusšūnas domēna IV C-terminālajai daļai (Cho et al. 2003; Nielsen et al. 2009). Terapeitisko efektu veic saistoties pie audzēja šūnas, samazinot audzēja šūnu spēju augt un dalīties, aktivējot organisma imūno atbildi anti-HER2-antivielas-atkarīgo šūnas-mediēto citotoksicitāti vai inhibējot MAPK un PI3K/Akt signālceļus. Sākotnēji šo medikamentu izmantoja metastātisku krūts audzēja gadījumā ar aptuveno efektivitāti 26% (Junttila et al. 2009; Vu and Claret 2012). Trastuzumabam ir atrasts sinerģisks, terapeitisks efekts kopā ar tādiem medikamentiem kā nimotuzumabs, docetaksels un karboplatīns. Pie tā blakus efektiem pieskaita hronisku sirds mazspēju. Otrs medikaments šādā humanizētā monoklonālā anti-HER2 antivielu grupā ir pertuzumabs (*Perjeta*), kas spēj piesaistīties HER2 ārpusšūnu domēnam līdzīgi kā trastuzumabs, taču atšķiras piesaistes domēns. Pertuzumaba pielietošana kopā ar trastuzumabu un docetakselu ir apstiprināta terapija HER2+ krūts vēža gadījumā, kas uzlabo laika periodu bez invazīvu audzēju attīstības par 57.8% HER+ audzējiem, salīdzinājumā ar HER- audzējiem (Loibl et al. 2017; von Minckwitz et al. 2017). Ar šo medikamentu tiek asociētas tādas blakus parādības kā febrilā neitropēnija un caureja. Pēdējo gadu laikā aizvien biežāk vēža terapijas pētniecībā tiek apskatīta programmētā šūnu nāves receptora 1 (PD1). PD1 ir membrānas proteīns, ko ekspresē daudzas imūnas sistēmas šūnas, tajā skaitā efektorās T-šūnās. Uz PD1 ir divi ligandi – PDL1 un PDL2. PDL1 ekspresija uz audzēja šūnām inhibē pret-audzēja efektu, saistoties ar efektoru T-šūnu PD1, tāpēc PD1 inhibē tādi PD1 inhibitori, anti-HER2 antivielas, kā nivolumabs (*Opdivo*) un pembrolizumabs (*Keytruda*), lai ārstētu metastātiskus melanomas audzējus un plaušu vēzi. Klīniskajos pētījumos ir parādīta tā efektivitāte TNBC gadījumos uzlabojot laika periodu bez audzēja progresijas par 20% (Hu et al. 2017). PDL1 ekspresējās 20% TNBC gadījumos un 50% visos vēža gadījumos. Anti-PDL1 ir inhibitors, kas piesaistās PDL1 un bloķē audzēja šūnu maskēšanos no imūnās sistēmas. Šādas anti-PDL1 antivielas komerciāli ir pieejamas kā durvalumabs, avelumabs un atezolizumabs (*Tecentriq*), ar ko 1. klīniskās stadijas pētījumā ir izdevies parādīt 19% efektivitāti TNBC pacientiem (Gibson 2015; Sabatier et al. 2015). TNBC audzējos, organismā var atrast daudz audzēju infiltrējošos limfocītus, kas ir T-šūnās, kas padara bazālos audzējus imunoloģiski aktīvus un dod iespēju tos ārstēt izmantojot jauna veida mērķēto imūno terapiju (Stanton and Disis 2016).

### 1.5.3 Ķirurģija

Krūts vēža ķirurģisko procesu iedala divās grupās – Ekscīzijā un mastektomijā. (1) Audzēja ekscīzija ir audzēja un mazas robežas veselu audu ķirurģiska izgriešana ap audzēju. Ja audzējs ir invazīvs, tad tiek rekomendēta arī staru terapija pēc operācijas veikšanas, tajā skaitā DCIS gadījumā. Ekscīziju dažreiz veic arī kombinācijā ar krūšu saglabāšanas ķirurģiju, daļēju mastektomiju, kvadrantektomiju vai segmentālo mastektomiju. Sievietēm ar jauni atklātiem krūts audzējiem un noteiktām *BRCA1/2* mutācijām tiek piedāvāta krūts saglabāšanas operācija tāpat kā tādu gēnu mutāciju nēsātājām kā *CHEK2* vai *ATM*, taču šī opcija nav vēl iekļauta vadlīnijās, ņemot vērā relapses risku (Vallard et al. 2019). Mutāciju statuss pats par sevi nav pietiekams, lai tiktu izvēlēta terapija. (2) Mastektomija ir krūts ķirurģiska terapijas taktika, ķirurģiska krūts izņemšana, ko iedala vairākās kategorijās – ādu saglabājoša mastektomija, krūtsgala saglabāšanas mastektomija, ko piedāvā *BRCA1/2* mutāciju un citu vidēja riska gēnu mutāciju gadījumā un pilna mastektomija.

### 1.5.4 Radiācijas terapija

Radiācijas terapija ir rentgena staru vai citu radioaktīvu daļiņu pielietošana, lai iznīcinātu audzēja šūnas. To iedala dažādu veidu terapijas procesos. (1) Ārējās plūsmas radiācijas terapija – Visbiežāk pielietotais radiācijas terapijas veids, kurā apstarošanu veic iekārta no ķermeņa ārpusē, visbiežāk pozicionējot tikai uz audzēja skarto reģionu, ja tas ir iespējams, lai mazinātu radiācijas saistītās sekas. (2) Iekšējā-operācijas radiācijas terapija – Staru terapijas veids, kurā radiācija tiek pielietota izmantojot zondi, kuru operācijas laikā tiek pielikta tuvu audzēja audiem. (3) Brahiterapija – Radiācijas terapija, kurā radioaktīvais aģents speciālā iekārtā tiek ievietots audzējā un terapeitiskais efekts tiek iegūts pāris nedēļu vai pat pāris mēnešu laikā, ierīcei palēnām izdalot radioaktīvo materiālu noteiktā lokācijā. Gan iekšējā-operācijas radiācijas terapija, gan brahiterapija tiek pielietota ļoti reti, taču tiek ieteikta gadījumā, ja apstarošana jāveic vietā, kur tuvumā ir vitāli vai reproduktīvi orgāni, lai mazinātu veselo audu bojājumus. Radiācijas terapiju var veikt pirms operācijas veikšanas, lai samazinātu audzēja izmēru, līdz to ir iespējams operēt. Šādu terapijas veidu sauc par neoadjuvantu radiācijas terapiju. Pēc operācijas radiācijas terapiju, jeb adjuvanto radiācijas terapiju pielieto pēc audzēja ekscīzijas un ķīmijterapijas, lai pārlicinātos, ka, ja operācijas laikā organismā palika audzēja reģionā kādas audzēja šūnas, tās nespēj turpiņāt nekontrolēti dalīties.

### 1.5.5 Molekulāro signālceļu ietekmējošie medikamenti

Pēdējo piecu gadu laikā tiek klīniskajos pētījumos pētīti specifisku signālceļu ietekmējošie medikamenti, kas tiek tieši saistīti ar audzēju iniciāciju un progresiju. Šo medikamentu grupā tiek mērķēti sekojošie signālceļi: PI3K-AKT-mTOR un RAS-RAF-MAPK, kā arī HDAC, CDK un PARP (8. attēls).

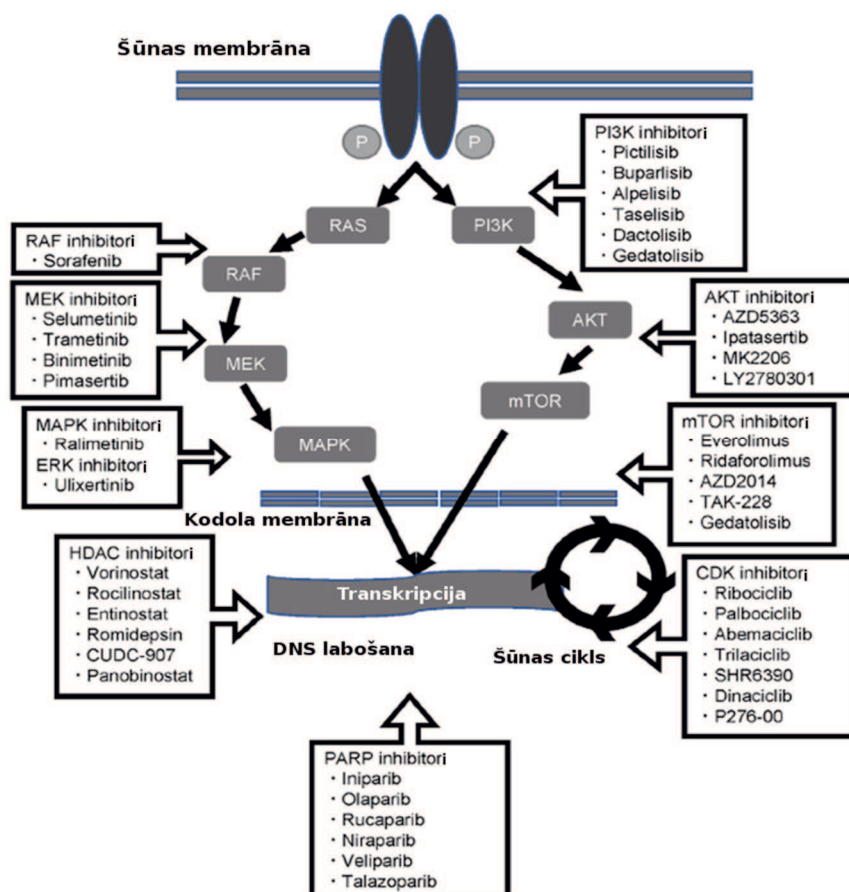
Fosfoinositīda 3-kināzes (PI3K), proteīna kināzes B (AKT) un rapamicīna mehāniskā mērķa (mTOR) signālceļu regulācijas traucējumi piedalās audzēju attīstībā un progresijā. PI3K-AKT-mTOR saikne ir viena no visbiežāk skartajām krūts vēža gadījumā. Visbiežāk atrastie gēni Ķīnā un Japānā veiktos pētījumos ar somatiskajām mutācijām ir *PIK3CA* (38-44%), *PIK3R1* (17-38%), *AKT3* (15%), *TP53* (15%), *AKT1* (13%) un *PTEN* (12%) (Chen et al. 2018). Līdz ar šo signālceļu nozīmi audzēja progresijā, tiek pētītas sekojošas medikamentu grupas– PI3K inhibitori, mTOR inhibitori, AKT inhibitori. No **PI3K** inhibitoriem visvairāk pētīts ir buparlisibs, kuru pielietojot kombinācijā ar fulvestrantu pēc aromatāzes inhibitoru pielietošanas, pēc-menopauzes vecuma sievietēm ar hormonu receptoru pozitīvu, HER2 negatīvu krūts vēzi rezultējās ar ilgāku laika periodu bez audzēja progresijas salīdzinājumā ar placebo kontroli (6.9 mēneši pret 5 mēnešiem, attiecīgi). Medikamenta efekts izteikti tika novērots pacientiem ar PI3K aktivētu signālceļu klīniskajos trešās fāzes pētījumos BELLE-2 un BELLE-3. Klīnisko pētījumu trešo fāzi vēl nav sasnieguši sekojošie medikamenti – pictilsibs, alpelidibs un taselisibs (Di Leo et al. 2018). No **mTOR** inhibitoriem galvenokārt tiek pielietots everolimus, ko pielieto kombinācijā ar aromatāzes inhibitoriem, piemēram, eksemestāns. Pielietojot everolimus kombinācijā ar eksemestānu BOLERO-2 klīniskajā trešās fāzes pētījumā, hormonu receptoru pozitīviem krūts vēža pacientiem novēlotā stadijā, pēc nestreīdo aromatāzes inhibitoru pielietošanas rezultējās ar ilgāku laika periodu bez audzēja progresijas, salīdzinot ar placebo (6.9 mēneši pret 2.8 mēnešiem, attiecīgi). Everolimus pielietošana ir efektīvāka, ja pacientam ir atrastas mutācijas gēnos *FGFR1*, *CCND1* un *PIK3CA*, vai ar šiem gēniem saistītajos signālceļos (Hortobagyi et al. 2016). No **AKT** inhibitoriem viens no vispētītākajiem ir ipatasertib, ko pielieto kombinācijā ar paclitaxel, piemēram, otrās fāzes klīniskajā pētījumā LOTUS, kurā neoperējamiem TNBC novēlotas stadijas lokalizētiem audzējiem vai metastatisku audzēju pacientiem. Ipataerstib pielietošana, salīdzinot ar placebo, palielināja laika periodu bez audzēja progresijas (4.9 mēneši pret 6.2 mēnešiem, attiecīgi) un pacientiem ar zemas PTEN ekspresijas audzējiem, tika novērots pozitīvāks terapeitiskais efekts ipatasertib, uzlabojot vidējo laika periodu bez audzēja

progresijas no 3.7 mēnešiem uz 6.2 mēnešiem (Kim et al. 2017). Pielietojot citu AKT inhibitoru- AZD5363, izdevās iegūt 5.5 mēnešus periodu bez audzēja progresijas pacientiem ar *AKT1* E17L-mutantu ER+ krūts vēzi, parādot to, ka pēc specifisku gēnu mutācijām var pielāgot vēža terapiju un uzlabot krūts vēža pacienta dzīves kvalitāti (Hyman et al. 2017). Mazāk pētīti grupas medikamenti ir MK2206 un LY2780301.

**RAS/RAF** signālceļš ir iesaistīts šūnu proliferācijā un angiogēnēzē. Viens no medikamentiem šajā grupā ir sorafenibs, kas inhibē vairākas kināzes un viens no tā mērķiem ir Raf-1, kas piedalās RAF/MER/ERK signālceļā, taču šī medikamenta pielietošana RESILIENCE trešās fāzes klīniskajā pētījumā nepierādīja savu efektivitāti lokalizētiem vai metastatiskiem HER2- audzējiem, kuriem bija rezistence pret taksānu un antraciklīnu. MAPK p38 ir proteīnu kināze, ko aktivē citokīnu stimulācija un ultravioletā apstarošana. Tam ir liela nozīme citokīnu regulācijā un šūnu izdzīvošanas procesā. Ralimetinibs ir MAPK p38 selektīvais mazmolekulu inhibitorais medikaments, kuram ir pierādīta pielietošanas drošība un farmakokintētika, taču medikamenta klīniskie pētījumi vēl tiek veikti (Patnaik et al. 2016).

Epiģenētiskie faktori tiek aktīvi pētīti, lai noskaidrotu veidus kā izvairīties no krūts vēža terapijas rezistences veidošanās. Histonu deacetilāzes (**HDAC**) kontrolē histonu acetilācijas pakāpi, līdz ar to- gēnu ekspresiju, tāpēc dažādi HDAC inhibitori tiek pētīti ar pielietojumu onkoloģiskajā terapijā. Entinostats ir izoformas-selektīvais HDAC inhibitors, kas tiek pielietots, lai novērstu rezistences veidošanos pret endokrīno terapiju ER+ krūts vēža pacientiem. Otrās fāzes klīniskajā pētījumā ENCORE301 tika izvērtēta entinostata efektivitāte kombinācijā ar eksemestānu, salīdzinājumā ar tikai eksemestāna pielietošanu, rezultējoties ar iegūtu ilgāku laiku bez audzēja progresijas (4.3 mēneši pret 2.3 mēnešiem, attiecīgi) (Yardley et al. 2013). Ciklīna D-CDK 4/6 inhibitors ietekmē CDK4 (INK4) – retinoblastomas (Rb) signālceļu, kam ir svarīga nozīme šūnas cikla regulācijā. CDK4/6 inhibitors inducē šūnu izešanu no šūnas cikla G1 fāzes, kas spēj apturēt nokontrolētu šūnu proliferācijas uzsākšanos (Kwapisz 2018). Klīniskajos pētījumos ir pārbaudīti trīs CDK4/6 inhibitorie medikamenti – Palbociklībs, ribociklībs un abemaciklībs, pacientiem ar ER+ recidivējošu vai metastatisku audzēju, kombinācijā ar endokrīno terapiju, ievērojami palielinot laiku bez audzēja progresijas (Turner et al. 2015; Finn et al. 2016; Hortobagyi et al. 2016). **PARP** (Poly-ADP ribozes polimerāze) ir proteīns, kas piedalās šūnas labošanas procesā un PARP inhibitoru pielietošana spēj apturēt dubultpavediena labošanas procesu, izsaucot šūnu apoptozi. BRCA1/2 ir proteīni ir ļoti nozīmīgi DNS dubult-pavediena pārrāvumu labošanā. Pacientiem ar *BRCA* mutācijām, *BRCA* funkcija ir nepietiekama, lai veiktu DNS pavedienu labojumus, tāpēc tiek pielietoti PARP inhibitori šūnu nāves

inducēšanai. Iniparib ir pirmais medikaments, kas tika pārbaudīts trešās fāzes klīniskajā pētījumā, taču tā efektivitāte netika pierādīta un ir izteikti pieņēmumi, ka šis medikaments īsti nestrādā kā PARP inhibitors. Olaparib ir otrais šīs grupas medikaments, kurš ir sasniedzis trešo fāzi klīniskajā pētījumā OlympiAD. Olaparib tika salīdzināts ar standarta ķīmijterapiju (vinorelbīns, eribulīns un kapecitabīns) HER2 negatīviem metastatiskiem pacientiem ar BRCA mutācijām, kuri nebija saņēmuši vairāk par diviem ķīmijterapijas kursiem. Olaparib grupā tika novērots palielināts dzīves ilgums bez audzēja progresijas, salīdzinot ar ķīmijterapijas grupu (7 mēneši pret 4.2 mēnešiem, attiecīgi) (Robson et al. 2017). Trešais medikaments šajā grupā ir talazoparib, kam klīniskajā 3.fāzes pētījumā EMBRACA, novēlotiem krūts vēža pacientiem ar BRCA mutācijām tika parādīts palielināts dzīves ilgums bez audzēja progresijas, salīdzinājumā ar placebo (8.6 mēneši pret 5.6 mēnešiem, attiecīgi). Talazoparibs ir duāla mehānisma PARP inhibitors, jo tas inhibē PARP enzīmu, kā arī tas aptur PARP darbību uz DNS, apturot BRCA mutētu šūnu labošanas procesu, rezultējoties ar BRCA mutēto šūnu apoptozi (Litton et al. 2018).



8. attēls – Potenciālie molekulāro signālceļu ietekmējošie medikamenti vēža terapijā. Attēls pielāgots, balstoties uz (Naito and Urasaki 2018).

Figure 8 - Molecular pathways and potential targeted agents for breast cancer Image was adapted based on (Naito and Urasaki 2018).

Personalizētās terapijas pielietošana ir vitāla, jo tā samazina vai dažkārt izslēdz daudzus, nevēlamus blakus efektus, kas tiek asociēti ar audzēju pirmās līnijas terapiju. Dažkārt šo situāciju pasliktina nepietiekami vai nepareizi klasificēts audzēja subtips un tam sekojoša neatbilstoša terapijas izvēle. Kamēr terapija tiek pielāgota pacientam uz izslēgšanas principu, iepriekš pielietotās terapijas var atstāt veselību vai pat dzīvību ietekmējošas sekas.

## 1.6 Šķidrās biopsijas

Pacienta audzēja audu histoloģiskā analīze ir pašlaik pielietotais zelta standarts audzēja noraksturošanā, taču pēdējos desmit gados ir aktualizēta tēma par šķidro biopsiju pielietošanu diagnostikā un klīnisko notikumu savlaicīgā paredzēšanā. Šķidrās biopsijas ir ķermeņa bioloģisko šķidrumu paraugs, kas satur dažāda veida audzēja izcelsmes materiālu, piemēram, DNS, RNS, cirkulējošās audzēja šūnas vai ārpusšūnu vezikulas. Lai gan tās iegūst no urīna, asins vai citiem ķermeņa šķidrumiem, šķidro biopsiju analīzes metodes ir ļoti atšķirīgas. Atsevišķas audzēja šķidrās biopsijas var sniegt jaunu informāciju par primāro audzēju vai papildināt viena otru.

Šķidrās biopsijas ir pirmo reizi pieminētas 1948. gadā, kad asinsritē tika konstatētas šūnu brīvās DNS. 1977.gadā tika pirmo reizi atklāts palielināts cfDNS daudzums pacientiem ar vēzi (Leon et al. 1977). 2005. gadā pirmo reizi tika noteiktas pacientu cfDNS punktveida mutācijas, kas aizsāka mutāciju analīzi šūnu brīvajā DNS, to pielietojot kā šķidro biopsiju (Diehl et al. 2005).

Pašlaik praksē pielietotās standarta biopsijas ir invazīvas, radot iekaisuma risku, kā arī audzēja heterogenitātes dēļ, biopsijā iegūtais audu paraugs nereprezentē visu audzēja molekulāro profilu un var sniegt kļūdainu informāciju par audzēja stadiju, agresivitāti un spēju metastazēt. Cilvēka bioloģiskajos šķidrumos cirkulējošā ģenētiskā materiāla analīze varētu aizstāt standarta biopsijas kā mazāk invazīvu metode.

Šķidrās biopsijas iedala vairākās kategorijās:

1. Cirkulējošās audzēja šūnas (CTCs);
2. Ārpusšūnu vezikulas (EVs);
3. Šūnu-brīvā RNS (cfRNA);
4. Šūnu-brīvā DNS (cfDNA).

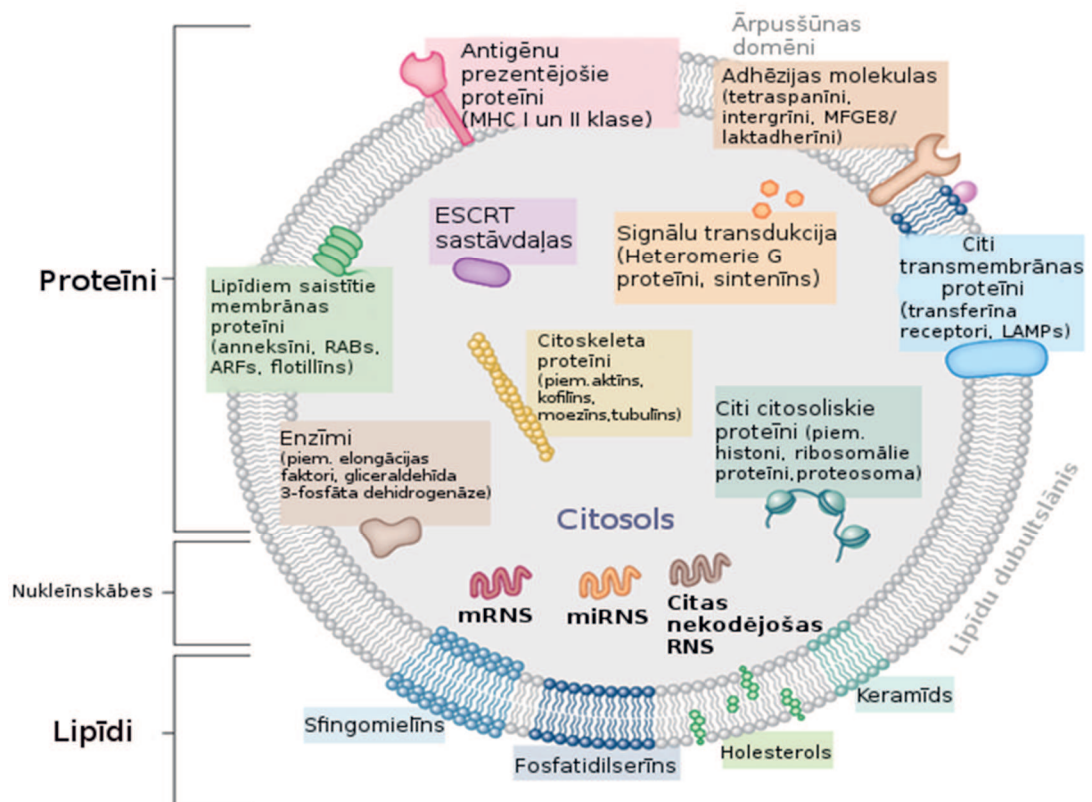
### 1.6.1 Cirkulējošās audzēja šūnas

Lielākā daļa no audzēju nāves gadījumiem ir saistīti ar metastāzēm. Atsevišķas šūnas vai šūnu kūlīši no audzēja var atdalīties no primārā audzēja un nokļūt asinsritē, kur tas cirkulē līdz sekundārās lokācijas piesaistei. Šīs metastāzes, kas atrodas asinsritē tiek sauktas par cirkulējošām audzēja šūnām. Asinsritē, kopā ar miljardiem eritrocītiem un miljoniem leukocītu, vienā mililitrā, CTCs ir sastopamas ļoti reti, līdz ar to, šo šūnu izolēšana vai raksturošana ir tehniski ārkārtīgi sarežģīta. Pirmo reizi audzēja šūnas asinsritē atklāja 1869.gadā (Ligthart et al. 2013). Ir izveidotas vairākas iekārtas, kas atļauj izdalīt un raksturot CTCs no asins parauga. Cristofanilli *et al.* ir atraduši korelāciju starp CTC skaitu un izdzīvošanas iespējamību, kā arī izdzīvošanas periodu bez audzēja progresijas agrīnā un metastatiska audzēja gadījumā, ko vēlāk apstiprināja vairāki, jauni pētījumi (Cristofanilli et al. 2004; Bidard et al. 2014). Ārpus CTC skaita, liela nozīme ir arī šo šūnu raksturojumam un fenotipēšanai. Līdz šim, metastatiska audzēja šūnu raksturojumu veic, ņemot biopsiju no primārā vai metastastāzejošā audzēja, taču šī metode ir invazīva, dārga, procesā var veicināt jaunu metastāžu veidošanos kā arī atkarībā no lokācijas, tas var nebūt iespējams. CTC iegūšana no asinsrites ir mazāk invazīva metode precīzākai metastatiskā profila raksturošanai un līdz ar to, tās pieskaita pie šķidrām biopsijām. Šīs šūnas varētu pielietot arī pie farmakodinamiskās analīzes, skatoties uz pielietotās metastatiska audzēja terapijas efektivitāti gan CTC skaita samazinājumā, gan to molekulārā sastāva izmaiņās.

### 1.6.2 Ārpusšūnu vezikulas

Balstoties uz biogēnēzes mehānismiem, EVs iedala trīs grupās – eksosomas, mikrovezikulas un apoptotiskie ķermenīši. Eksosomas ir vismazākās no EVs, kuru izmērs ir aptuveni 30-100 nm diametrā. Tās veidojas caur intraluminālo vezikulu atbrīvošanu ārpusšūnas telpā, multivezikulārajam ķermenītim saplūstot ar šūnas membrānu. Mikrovezikulas (MVs) ir lielākas par eksosomām un to diametrs ir aptuveni 50-1000 nm. Tās veidojas plazmatiskajai membrānai pumpurojoties. Apoptotiskie ķermenīši veidojas vēlīnajās apoptozes stadijās, apoptotisko šūnu fragmentācijas rezultātā. To galvenā fizioloģiskā loma ir novērst apoptotisko šūnu satura nokļūšanu ekstracelulārajā telpā, tādējādi neizraisot iekaisumu, autoimunās reakcijas un audu bojājumus. To izmērs ir ļoti dažāds, sākot ar 50 nm līdz 5 μm (Minciacchi et al. 2015).

Galvenais kopsaucējs visām EVs ir tas, ka tās visas aptver lipīdu dubultslānis un tās satur dažādus proteīnus un nukleīnskābes, taču to daudzums un dažādība variē. EVs satur citoskeleta proteīnus (piemēram, aktīns, tubulīns), ar lipīdu transportu saistītus proteīnus (piemēram, RABs), citosoliskus proteīnus (piemēram, ribosomālie proteīni), enzīmus un adhēzijas molekulas (piemēram, tetraspanīni - CD63, CD81, CD9, un integrīni). Daudzi no EV sastāvā esošajiem elementiem piedalās to biogēnēzē vai fizioloģiskās funkcijās, piemēram, ESCRT kompleksa sastāvā esošie ALIX un TSG101 proteīni tiek uzskatīti par universāliem EV marķieriem un tos izmanto, lai pārbaudītu EV esamību paraugos. Par EV marķieriem var izmantot arī tetraspanīnus CD9, CD63 un CD81. EV membrāna satur tādus lipīdus kā sfingomielīns, fosfatidilserīns, holesterīns un keramīds (9.attēls). Cik zināms, nav atklāti proteīnu marķieri, kuri būtu specifiski katram EV tipam, taču apoptotiskajiem ķermenīšiem bieži ir sastopami tādi virsmas marķieri kā N-acetilglikozamīns, kalretikulīns un fosfatidilserīns, kuri, ļaujot tos atpazīt makrofāgiem, nodrošina to tālāku fagocitozi. Apoptotisko ķermenīšu sastāvā ir sastopami arī DNS fragmenti un histoni, taču, jaunākie pētījumu liecina, ka tie ir atrodami arī eksosomās un mikrovezikulās (Kalluri and LeBleu 2016). Ir parādīts, ka eksosomas, kuras veidojas no dažādām vēža šūnu līnijām, var saturēt dsDNS fragmentus. To izmērs ir sākot no 100 bp līdz 10 kb un salīdzinošās genomiskās hibridizācijas analīze atklāja visu šūnu DNS genoma pārklājumu, kaut arī tikai aptuveni 10% no eksosomām saturēja DNS (Thakur et al. 2014). Ekstracelulārās vezikulas satur arī dažādus RNS subtipus, tajā skaitā mRNS, miRNS, rRNS, lncRNS, tRNS, piRNS, vault RNS un Y-RNS, bet to proporcionālie daudzumi variē atkarībā no EV subtipa, EV producējošo šūnu tipa un fizioloģiskā stāvokļa. EV sastāvā nokļūstošās RNS tiek šķirotas EV biogēnēzes laikā un tām ir liela loma EV funkcijās, jo, piemēram, miRNS, kas atrodas EVs spēj kontrolēt gēnu ekspresiju mērķšūnās (Qiao et al. 2013). Ir parādīts, ka visi EV subtipi, satur vēzim specifiskās somatiskās mutācijas nesošus dsDNS fragmentus (Lazaro-Ibanez et al. 2014). Šie atklājumi liecina par to, ka vēža-izcelsmes EVs varētu tikt pielietotas, lai analizētu tajās audzēja somatisko mutāciju frekvences izmaiņas, kas sniegtu informāciju par audzēja attīstību arī krūts vēža gadījumā.



9. attēls. EV sastāvs. EV sastāvā ir lipīdi, nukleīnskābes un proteīni. Tādi lipīdi kā sfingomielīns, fosfatidilserīns, holesterols un keramīds, veido lipīdu dubultslāni. Proteīnu sastāvs EVs ir- ar lipīdiem saistītie membrānas proteīni, transmembrānas proteīni, adhēzijas molekulas, citosoliskie proteīni, citoskeleta proteīni, ESCRT sastāvdaļas. Sastāvā esošās nukleīnskābes veido mRNA, miRNA un citas nekodējošas RNS. Attēls pielāgots balstoties uz (Colombo et al. 2014).

Figure 9. The content of EVs. EVs contain lipids, nucleic acids and proteins. Lipids, such as sphingomyelin, phosphatidylserine, cholesterol and ceramide, form the lipid bi-layer. Proteins are – lipid-bound proteins, transmembrane proteins, adhesion molecules, cytosolic proteins, cytoskeletal proteins and ESCRT components. Nucleic acids consist of mRNA, miRNA and other non-coding RNA. The image was adapted, based on (Colombo, Raposo et al. 2014).

### 1.6.3 Šūnu brīvā RNS

Šūnu brīvā RNS tiek maz pētīta, jo tā ir izteikti nestabila. Tās visbiežāk atrodas mRNA vai mikroRNS formā un ir nekodējošas. Cirkulējošo RNS var sastapt asinsrites cirkulācijā, ribonukleoproteīnu kompleksu sastāvā vai arī ārpusšūnu vezikulu sastāvā, kas spēj pasargāt šo ģenētisko materiālu no nukleāžu aktivitātes. Cirkulējošā miRNA spēj saistīties ar augta blīvuma lipoproteīniem vai RNS-saistošiem proteīniem un tiek pieņemts, ka šādi kompleksi var tikt izdalīti gan no dzīvām, gan mirušām šūnām. cfRNA tiek izvirzīts kā vēža biomarkiera kandidāts (Souza et al. 2017). Daļa no šīs kodējošās vai nekodējošās cirkulējošās RNS ir iesaistīta gēnu translācijā un gēnu ekspresijas regulācijā.

#### 1.6.4 Šūnu brīvā DNS

Cirkulējošā šūnu brīvā DNS tika atklāta pirms vairāk nekā 70 gadiem, taču tā pielietojums diagnostikā un prognostikā ir aktualizēts pēdējo gadu laikā. To izmanto kā mazāk invazīvu biomarķieri, aizvietojot pašlaik operācijas rezultātā iegūto biopsiju, tādējādi samazinot komplikāciju sastopamību kā arī infekcijas risku. Tā ir sastopama gan veselu, gan slimu cilvēku bioloģiskajos šķidrumos, taču daļa no tās – cirkulējošā audzēja DNS (ctDNS) ir sastopama tikai pacientiem ar vēzi. ctDNS veidojās audzēja šūnām ejot bojā nekrozese vai apoptozes procesos gan primārajā audzēja lokācijā, gan asinsritē, aizejot bojā cirkulējošām audzēja šūnām. To fragmenta garums ir aptuveni 80-200 bp. Ir novērots, ka audzēja gadījumos, cfDNS daudzums spēj pieaugt 5-20 reizes, salīdzinājumā ar tās daudzumu veseliem pacientiem (Diehl, Li et al. 2005). Lai gan tās daudzums vien nav pietiekams indikators, pēc kā var diagnosticēt slimības, cfDNS ģenētiskā analīze izmantojot augstas jutības iekārtas kā NGS, mikrorindas vai ddPCR ir potenciāli rīki diagnostikā un slimības gaitas novērošanā (Lin et al. 2017)

### 3. MATERIĀLI UN METODEDES

#### 3.1 Materiāli

##### 3.1.1 Pacientu audu un asins paraugi

Pētījumā tika iesaistītas IIIA-IIIIC krūts vēža pacientes, kas veica diagnostiskos izmeklējumus un saņēma ārstēšanu RAKUS Onkoloģijas centrā. Pētījumā tika iekļautas pacientes no 18 gadu vecuma ar dažādiem krūts vēža molekulārajiem subtipiem (trīskārši negatīvais, luminālais A, B, HER2+). Izslēgšanas kritēriji: cita onkoloģiska saslimšana; iepriekšēja ķīmijterapija, staru terapija vai hormonāla terapija; asins vai asins komponentu pārlišana pusgada laikā pirms paraugu ņemšanas. Pacientu informēšana un iesaistīšana pētījumā notika atbilstoši Valsts Iedzīvotāju Genoma Datubāzes (VIGDB) un RAKUS/LU Biobankas gēnu donoru iesaistes protokoliem. Katrai pacientei sešos noteiktos laika posmos tika paņemti asins paraugi EDTA un specializētos cfDNS (Roche, Streck) stobros, kā arī audzēja audu paraugi - standarta diagnostisko izmeklējumu laikā ņemta biopsija un no operācijas materiāla iegūts audzēja audu paraugs, kas paliek pāri pēc standarta histoloģisko izmeklējumu veikšanas. EDTA stobros ņemtais asins paraugs tika apstrādāts 1 stundas laikā pēc parauga paņemšanas. Plazma tika atdalīta centrifugējot stobru 2X10 min, istabas temperatūrā pie 1500 g, pārnesta jaunā stobrā un iesaldēta pie -70°C. Pacienti tika pseidoanonimizēti un pacientu dati un paraugi tika kodēti, izmantojot VIGDB kodēšanas sistēmu. Visi paraugi tika paņemti pēc tam, kad paciente bija saņēmusi informāciju par šo pētījumu un devusi rakstisku piekrišanu tajā piedalīties. Pētījumu ir apstiprinājusi Latvijas Centrālā Medicīnas Ētikas Komisija (lēmums Nr.01-29.1/487).

##### 3.1.2 Iekārtas un materiāli

1-1. Tabula

Izmantotā aparatūra un aprīkojums.

Table 1-1

Used equipment.

Iekārta	Ražotājs / Apraksts
Vortekss tipa maisītājs	Vortex genie, Scientific Industries, ASV
Autoklāvs	Labo MLS-3020U, Sanyo, Japāna
Kelvinators	MDF-U53V, Sanyo, Japāna
Centrifūgas	Labcare Sigma 1-15PK, Lielbritānija Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Itālija
Laminārās plūsmas kabinets	Kojair BLOWIZARD Class II BSC, KOJAIR, Vācija DNA/RNA UVC/T-M-AR, Biosan, ASV
Magnētiskais maisītājs	Labmixer Magneti stirrer, Labotek, Dānija
Vilkmes skapis	MSZ 6619, Ezermeister ISZ, Ungārija

Izmantotā aparatūra un aprīkojums.

Table 1-2

Used equipment.

Iekārta	Ražotājs / Apraksts
Spektrofotometrs	Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, ASV
BluePippin	Sage Science, ASV
Transmisijas elektronmikroskops	JEM-1230 transmission electron microscope, JEOL, ASV
Nanoparticle tracking analysis device	N300, Malvern Pananalytical, ASV
Digitalālais PCR	QX 200 Droplet generator and reader, Biorad, ASV
Reālā laika kvantitatīvais PCR	ViiA 7, Applied Biosystems, ASV.
Daļiņu izmēra, Zeta potenciāla un molekulasmasas analizators	Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Lielbritānija
Nanodaļiņu izsekošanas analīzes ierīce	NS300, Malvern Instruments Ltd, Lielbritānija

Izmantotie materiāli.

Table 2-1

Used materials.

Materiāls	Ražotājs / Apraksts
pH indikatora papīrs	Биохимреактив, Krievija
Ledus bloks	PCR Cooler for 96 well plates, Eppendorf, ASV
Mikropipetes	Eppendorf 1000 µL micropipette, Sigma-Aldrich, ASV
	Eppendorf 200 µL micropipette, Sigma-Aldrich, ASV
	Eppendorf 100 µL micropipette, Sigma-Aldrich, ASV
	Eppendorf 10 µL micropipette, Sigma-Aldrich, ASV
Parafilma	Parafilm M, Bemis flexible packaging, ASV
SEC kolonna	TELOS SPE Columns, Kinesis, Lielbritānija
SEC polietilēna frits	TELOS Polyethylene Frits, 15ml, Kinesis, Lielbritānija
Mikrocentrifūgas stobriņi	1.5 mL Safeseal tube, Sarstedt, Vācija
Falcon™ tipa stobri	15 mL Tube, Sarstedt, Vācija
	50 mL Tube, Sarstedt, Vācija
MBS filtrs	Methacrylate-butadiene-styrene filtropur S 0.2 µm, Sarstedt, Vācija
Šļirces	10 mL syringes, Wellspring Medical Supplies CO. LTD, Ķīna
Koncentrēšanas filtru stobri	Amicon Ultra 3k 0.5 mL Centrifugal Filters, Merck Millipore Ltd., Vācija
	Amicon Ultra 100k Centrifugal Filters, Merck Millipore Ltd., Vācija
cfDNS asins stobri	Roche cfDNA BCTs, Roche, Šveice
	Streck, ASV
EDTA vakuteineri	BD, Lielbritānija
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich, ASV
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Molekula, Lielbritānija

Izmantotie materiāli.

Table 2-2

Used materials.

<b>Materiāls</b>	<b>Ražotājs / Apraksts</b>
Cimdi	<i>Nitrile Examination Gloves</i> , Klinion protection, Nīderlande
Aizskrūvējama pudele	<i>Laboratory bottle GL-45, 500ml</i> , Duran, Vācija
10ml šļirce	Jiangsu Kanghua Medical Equipment Co., Ķīna
Non-stick, RNāžu brīvie centrifugācijas stobri	ThermoFisher Scientific, ASV
RNaseZap® RNāzes dekontaminācijas salvetes	Ambion®, Thermo Fisher Scientific, ASV
Mikropipetes uzgaļi ar filtru	<i>Biosphere Filter Tips</i> 10µl, Sarstedt, Vācija
	<i>Pipette tip</i> 200 µL, AHN Biotechnologie GmbH, Vācija
	<i>Biosphere Filter Tips</i> 1000 µL, Sarstedt, Vācija
Mikropipetes uzgaļi	<i>Pipette tip</i> 200 µL, Eppendorf, Itālija
	<i>Pipette tip</i> 1000 µL, Eppendorf, Itālija
	<i>Pipette tip</i> 10 µL, Sarstedt, Vācija

### 3.1.3 Pielietotie reaģentu un materiālu komplekti

3. tabula

Reaģentu un materiālu komplekti.

Table 3

Reagent and material kits.

<b>Reaģentu komplekts</b>	<b>Ražotājs</b>
MagMAX Cell-Free DNA Isolation Kit	Ref. A29319, Thermo Fisher Scientific, ASV
QIAseq Targeted DNA Panel (96)	Ref. 333505, QIAGEN, ASV
Deparafinizācijas šķīdums	Ref. 19093, QIAGEN, ASV
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	Ref. 56404, QIAGEN, ASV
HotStarTaq DNS polimerāze (250)	Ref. 203203, QIAGEN, ASV
Nukleāžu brīvais ūdens	Ref. 129114, QIAGEN, ASV
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Ref. 5067-4626, Agilent Technologies, ASV
Human Breast Cancer Panel	Ref. DSH-001Z, QIAGEN, ASV

### 3.1.4 Bufersķīdumu sagatavošana

#### 1xPBS-DEPC

Viena PBS (*Phosphate buffered saline tablet*) tablete uz 200ml destilēta ūdens. Tabletes izšķīdina. Pievieno 1 µL DEPC (*Diethyl pyrocarbonate*) uz katru 1 mL PBS bufersķīduma un maisījumu sakrata. Atstāj līdz nākamajai dienai. Autoklāvē, nofiltrē (MBS 0.2 µm filtri) un pirms lietošanas nomēra pH (jābūt pH~7).

### 3.2 Darba drošības tehnika

Darbs laboratorijā tiek veikts ievērojot darba drošību. Pirms darba uzsākšanas, tiek dezinficēta darba virsma, izmantojot 70% etanola šķīdumu. Ieteicams ir arī ar spirtotu salveti noslaucīt izmantoto paraugu stobrus un visus pielietojamos rīkus, pat ja tie jau atradās uz darba virsmas vai laminārā. Laminārs katru dienu ir jāiztīra ar 70% etanola šķīdumu un 30 līdz 60 minūtes jāsterilizē ar laminārā uzstādīto UV lampu. Tas pats ir jādara ar telpu, kurā izmanto darba virsmas. Kamēr UV lampā laminārā vai telpā, kur atrodas darba virsmas ir ieslēgta, tajā nedrīkst uzturēties un ir aizliegts atstāt preparātus, reaģentus vai šūnas.

Darbojoties ar DEPC (*Diethyl pyrocarbonate*), hloroformu, līzēšanas buferi, un izopropanolu to atvēršana un lietošana jāveic velkmes skapī, jo to ieelpošana vai nokļūšana uz ķermeņa virsmas var būt kaitīga veselībai.

Strādājot ar cilvēka bioloģisko materiālu- šķidrumu vai audu paraugiem ir jālieto cimdi un laboratorijas halāts, lai izvairītos no paraugu saskares ar ādu vai gļotādu. Laboratorijā pielietotie mikropipetes uzgaļi un stobri, kas ir nonākuši saskarē ar cilvēka bioloģisko materiālu ir jāutilizē tiem paredzētajās bioloģisko atkritumu tvertnēs.

### 3.3 Asins paraugu apstrāde

EDTA asins stobri tiek plaši pielietoti klīniskajā vidē, asins analīzēm. Plazmas izdalīšana notiek ievietojot paraugu centrifūgā uz 10 minūtēm pie 1500 g, istabas temperatūrā. Plazmu pārnes jaunā 15 mL Sarstedt stobrā, atstājot aptuveni vienu cm plazmas virs leikocītu šūnu slāņa. Asins stobru tur pie +4° C laika periodā līdz trīs dienām. Plazmu centrifūgē pie 2000 g, 10 minūtes istabas temperatūrā. Centrifūgēto plazmu alikvotē pa 1 mL sagatavotos 1.4 mL stobros un iesaldē pie -70° C.

cfDNS asins stobri (Roche, Streck) ir speciāli piemēroti šūnu brīvā DNS fragmentu saglabāšanai. Šos asins stobrus pēc asins paraugu savāšanas kārtīgi sajauc ar stobrā esošo konservantu, invertējot to desmit reizes. Asins stobrs var stāvēt istabas temperatūrā (+20..25° C) laika periodu līdz septiņām dienām. Plazmas izdalīšana notiek centrifūgējot stobru 10 minūtes pie 1600 g, +21° C, pēc kā plazmu bez izgulsnētām asins šūnām pārnes jaunā 2 mL stobrā un centrifūgē pie 16 000 g, +21° C, lai iegūtu maksimālo plazmas tilpumu. Asins plazmu, neaizskarot izgulsnētās šūnu paliekas, pārnes jaunā *non-stick* 1.5 mL stobrā un iesaldē pie -70° C, līdz cfDNS izdalīšanas procesam.

### 3.4 Šūnu brīvā DNS izdalīšana

Šūnu brīvā DNS izdalīšana tika veikta no EDTA un cfDNS asins stobros iegūtās plazmas, izmantojot 'MAGMAX™ Cell-Free DNA isolation kit' reaģentu komplektu. Izdalīšanas gaitā tiek aizvietots reaģentu komplektā esošais 'Nuclease-free water' ar atsevišķi iegādātu, komerciāli pieejamu 'RNase-Free water', kas citādi var traucēt Agilent2100 bioanalizatora mērījumu veikšanu. Papildus protokolā minētajam - Veicot žāvēšanas stadiju, stobrus tur atvērtus laika periodā līdz 10 minūtēm un pārlicinās, ja nākamajā solī magnētiskās lodītes ir kārtīgi resuspendētas šķīdumā, citādi tas ievērojami ietekmēs iegūstamo cfDNS daudzumu. Magnētiskās lodītes spēj labāk piesaistīt cfDNS par membrānu filtriem, rezultējoties ar augstāku iegūto cfDNS daudzumu. Tā kā netiek pielietoti filtri vai vakuuma kolonnas, samazinās arī risks kolonnu nobloķēt ar šūnu paliekām, kas ir bieži sastopama problēma šādos proteīna bagātu paraugu apstrādes procesos. Reaģentu komplektā esošās lodītes ir pārklātas ar optimizētu silikāt-veidīgu pārklājumu, padarot tās piemērotas zemas koncentrācijas nukleīnskābju piesaistīšanai. Reaģentu komplektā esošais Lysis/Binding šķīdums nolizē paraugu un palīdz šūnu brīvajam DNS piesaistīties lodītēm, *Wash solution* tiek pielietots, lai mazgātu piesaistītās lodītes ar specifisku buferšķīdumu, taču 80% etanols palīdz aizvākt sāļus no mazgāšanas buferšķīduma, lai tiktu iegūts tīrs cfDNS, gala produktā.

Šūnu brīvā DNS tiek izdalīta no specifiskiem cfDNA saglabājošiem asins savākšanas stobriem no sekojošajām firmām- Roche (kat.nr. 07832397001) un Streck (kat.nr 218962).

Pirms plazmas izmantošanas, tā tiek apstrādāta ar Proteināzi K, lai nodegradētu plasmā esošos proteīnus un sagatavotu plazmu nukleīnskābju izdalīšanai - 800uL parauga pievieno 12 uL Proteināzi K (20mg/mL), samaisa un pievieno 40 uL 20% SDS (nepievienot SDS tieši pie proteināzes, jo tā tiks inaktivēta). Paraugu rūpīgi samaisa un 20 minūtes inkubē pie +60° C, ik pa brīdīm samaisot. Pēc ProK apstrādes atdzesē stobriņus līdz RT, uz 5 minūtēm novietojot tos uz ledus bloka. Izdalīšana notiek pēc sekojošā, modificētā izdalīšanas protokola (MAN0015629):

1. Plazmai pievieno 1000 uL *Lysis/Binding* šķīdumu, kā arī 12 uL *MagMax* lodītes. Rūpīgi samaisa, stobriņu invertējot 10 reizes.
2. Stobriņu ievieto magnētiskajā statīvā, patur 5 minūtes un supernatantu aizvāc.
3. Atstāj stobriņu magnētā vēl uz 1 minūti un aizvāc atlikušo supernatantu.
4. Lodītes resuspendē 1mL *Wash Solution* un pārnes 1.5mL *non-stick* stobriņā (*Lysis/Binding* stobriņu saglabā).

5. Ievieto jauno stobriņu magnētiskajā statīvā uz 20 sekundēm, savāc supernatantu un ar to izskalo veco *Lysis/Binding* stobriņu. Pārnes šo šķīdumu jaunajā stobriņā un veco *Lysis/Binding* stobriņu izmet.
6. Atstāj stobriņu vēl uz divām minūtēm magnētiskajā statīvā un tad aizvāc supernatantu.
7. Atstājot stobriņus uz magnētiskā statīva, padauza statīvu 5x pret galdu un aizvāc atlikušo supernatantu.
8. Izņem stobriņus no statīva, pievieno 1mL *Wash Solution* un vorteksē 30 sekundes.
9. Ievieto stobriņus magnētiskajā statīvā uz 2 minūtēm, tad aizvāc supernatantu.
10. Atstājot stobriņus uz magnētiskā statīva, padauza statīvu 5x pret galdu un aizvāc atlikušo supernatantu.
11. Izņem stobriņus no magnētiskā statīva, pievieno tiem 1mL svaigi pagatavotu 80% etanolu un vorteksē 30 sekundes.
12. Ievieto stobriņus magnētiskajā statīvā uz divām minūtēm, tad aizvāc supernatantu.
13. Atstājot stobriņus uz magnētiskā statīva, padauza statīvu piecas reizes pret galdu un aizvāc atlikušo supernatantu.
14. Atkārtoti 16.-18. soli.
15. Atstājot stobriņus statīvā, tos žāvē ar atvērtu vāciņu trīs līdz piecas minūtes.
16. Atstājot stobriņus uz magnētiskā statīva, padauza statīvu piecas reizes pret galdu un aizvāc atlikušo supernatantu.
17. Stobriņu izņem no statīva, resuspendē lodītes 25 uL nukleāžu-brīvajā ūdenī un vorteksē piecas minūtes.
18. Ievieto stobriņus magnētiskajā statīvā uz 2 minūtēm un pārnes cfDNA saturošo supernatantu jaunā stobriņā. Paraugus uzglabā pie -20° C.

### 3.5 DNS raksturošana

Lai varētu cfDNS pielietot tālākos pētījumos, ir nepieciešams izvērtēt tā kvalitāti un daudzumu. Šo procesu veic izmantojot Agilent 2100 bioanalizatoru – Augstas jutības DNS čipu, izmantojot ‘Agilent High Sensitivity DNA Kit, Agilent Technologies, ASV’ reaģentu komplektu un tā protokolu (G2938-90321). Ar šo metodi tika izvērtēts cfDNS daudzums kā arī konstruēto bibliotēku kvalitāte pirms un pēc fragmentu garuma selekcijas. Metodē tiek izmantots 1 µL DNS/cfDNS/bibliotēkas konstrukta.

Metode balstās uz mikroplūsmas automatizētu elektroforēzes procesu. Ar šo metodi var analizēt nukleīnskābes sākot no 1 µL tilpuma. Čipu mikroplūsmas kanālos elektroforēze noris mazos apjomos, nepatērējot lielu reaģentu un parauga daudzumu,

procesa ātrums ir ievērojami ātrāks par tradicionālo gēla elektroforēzi, kā arī analīze un datu apstrāde tiek veikta automatizēti, izslēdzot cilvēciskās kļūdas.

### 3.6 Bibliotēku garuma selekcija

Pirms bibliotēkas konstruēšanas tiek veikta izdalīto fragmentu pārbaude uz Agilent 2100 bioanalizatora, izmantojot augstas jutības DNS čipu (Skatīt 3.5). Pēc genomisko un FFPE DNS bibliotēku konstruēšanas bieži var novērot arī cita garuma fragmentus konstruktā, kas rada nepieciešamību attīrīt izveidoto bibliotēku izmantojot BluePippin. No 30  $\mu$ L bibliotēkas, kurai pievienots 10  $\mu$ L elektroforēzes buferšķīdums, galā iegūst izvēlētā garuma fragmenta 40  $\mu$ L bibliotēku.

Fragmentu izmēra selekcija tika veikta izmantojot BluePippin reaģentu komplektu, izmantojot 'BluePippin Quick Guide' protokolu un 3% agarozes gēla kasetes, izmēra selekcijai no 100-250 bp.

DNS paraugs tiek sadalīts agarozes gēla kasetēs, komerciālā reaģentu komplektā pieejamā buferšķīdumā. Tiek izvēlēts noteikts fragmenta garums, ko atļauj iekārta un attiecīgā kasete. Paraugs tiek ievadīts četrās no piecām kasetes bedrītēm pie negatīvā elektroda, ievadot vienā bedrītē arī DNS izmēra 'ladder'. Ieslēdzot iekārtu, tā elektroforēzes lādiņa ietekmē plūst pa kasetes kanālu un mainot kanāla virzienu uz otru pozitīvo elektrodu, elektriski eluē savākšanas kambarī no gēla kolonnas noteikta izmēra fragmentus kastes savākšanas kambarī. Mainot atpakaļ plūsmas virzienu pretī pirmajam, pozitīvajam elektrodam, no savākšanas kambara noteiktā izmēra fragmenti nokļūst savākšanas bedrītei, kā kontroli iekārtai izmantojot piektās bedrītes DNS izmēra 'ladder'. Lādiņa pulsa lauka ietekmē ir iespējams savākt vairāku garumu fragmentus.

### 3.7 DNS izdalīšana no FFPE

DNS izdalīšana tika veikta no audu parafīna blokiem, izmantojot 'Deparaffinization solution, QIAGEN, ASV' un balstoties uz 'QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, QIAGEN, ASV' reaģentu komplektā esošo protokolu. Tiek šķīdināti parafīna bloki speciālā šķīdumā, kas atļauj no audiem izdalīt ģenētisko materiālu. No FFPE bloka nogriež 8 griezumus 5-10  $\mu$ m biezumā, ieliek stobrā ar 1 mL deparafinizācijas šķīdumu, vorteksē, nocentrifūgē divas minūtes un supernatantu pārnes jaunā stobrā. Pievieno 1 mL 96% etanolu, vorteksē un nocentrifūgē divas minūtes un pārnes supernatantu jaunā stobrā. Supernatantu žāvē 10 minūtes pie +37°C, lai izgaro etanols. Resuspendē nogulsnes 180  $\mu$ L ATL buferšķīdumā

un pievieno 20  $\mu$ L proteināzi K. Savorteksē un inkubē vienu stundu pie +56°C, līdz parauks tiek nolizēts. Inkubē paraugu vienu stundu pie +90°C. Ievieto paraugu centrifūgā uz pāris sekundēm, lai nebūtu pilieni vāciņā, pievieno 200  $\mu$ L AL buferšķīdumu un savorteksē. Pievieno 200  $\mu$ L 96% etanolu un savorteksē. Lizātu ienes QIAamp MinElute kolonnā un ievieto centrifūgā uz vienu minūti pie 6000 g. Kolonnu pārnes jaunā 2 mL savākšanas stobrā un tajā ienes 500  $\mu$ L AW1 buferšķīdumu un ievieto centrifūgā uz vienu minūti pie 6000 g. Kolonnu pārnes jaunā 2 mL savākšanas stobrā un tajā ienes 500  $\mu$ L AW2 buferšķīdumu un ievieto centrifūgā uz vienu minūti pie 6000 g. Kolonnu pārnes jaunā savākšanas stobrā un ievieto centrifūgā uz trīs minūtēm pie 20 000 g, lai izžāvētu kolonnu. Kolonnu pārnes jaunā 1.5 mL *non-stick* savākšanas stobrā un tajā ienes 20  $\mu$ L ATE buferšķīdumu, ar kuru tiks eluēts FFPE DNS. Kolonnu ievieto centrifūgā uz vienu minūti pie maksimālajiem apgriezieniem, pēc kā DNS uzglabā pie -20°C.

### 3.8 Bibliotēku konstruēšana

Mērķētās sekvencēšanas bibliotēkas tika konstruētas izmantojot divus protokolus, atkarībā no izmantotā ģenētiskā materiāla. Genomisko DNS bibliotēku konstruēšanai tika izmantoti 40ng gDNS un FFPE bibliotēku konstruēšanai tika izmantoti 100ng DNS. FFPE DNS bibliotēkas tika konstruētas izmantojot ‘QIAseq Targeted Breast Cancer Panel (DHS-001Z), QIAGEN, ASV’ un tā protokolu HB-2168-003, attiecīgi pielāgojot darba procesu izmantotajam DNS, pēc protokolā minētās darba shēmas. Sekvencēšanas ‘QIASeq Targeted Breast Cancer panel’ tika papildināts ar *Booster* paneli – izvēlētiem 29 gēniem, tādējādi iegūstot unikālu krūts vēža gēnu paneli. Taču *Booster* paneļa sastāvu nav iespējams atklāt šī darba ietvaros saistībā ar izstrādes projekta komercnoslēpumu. Gala produkts – bibliotēka, tika iegūts 80  $\mu$ L tilpumā.

Tika izmantoti indeksi no reaģentu komplekta: ‘QIAseq 96-Index I set A (384), Qiagen, ASV’.

### 3.9 Sekvencēšana un datu apstrāde

Sekvencēšana tika veikta BMC Genoma Centrā, izmantojot Illumina Miseq iekārtu. Iegūto datu apstrādi un analīzi veica Dr.biol. Pāvels Zajakins izmantojot sekojošo apstrādes algoritmu:

1. ‘Illumina paired fastq’ amplikonu faili tika lejupielādēti izmantojot programmu bs.

2. UMI atpazīšana/skaitīšana/kvalitātes kontrole tika veikta izmantojot programmu fastp.
3. UMI apgrīšana tika veikta izmantojot programmu cutadapt.
4. Tika veikta kvalitātes kontrole izmantojot FastQC programmu.
5. Tika veikta kartēšana izmantojot 'Human Genome v38' ar programmu bowtie2.
6. Lasījumu sortēšanu veica izmantojot programmu samtools.
7. UMI deduplikācija (tajā skaitā korekcija un skaitīšana) tika veikta izmantojot programmu gencore.
8. Amplikonu kvalitātes analīzi veica izmantojot CODEX2 programmas paketi 'package/CoverView/iSeqQC'.
9. Individuālo variāciju atpazīšana tika veikta izmantojot programmu BCFtools.
10. Somatisku mutāciju filtrēšana tika veikta arī izmantojot programmu BCFtools.
11. Kopiju skaita variācijas analīze tika veikta izmantojot programmu cnvkit.

### 3.10 Kvantitatīvā PĶR

Metode balstās uz polimerāzes ķēdes reakciju, kurā ir iespējams detektēt parauga DNS eksponenciālo pieaugumu konkrētā ciklā izmantojot fluorescentu ziņotāj-molekulu bedrītē- SYBR Green. Palielinoties produkta DNS, palielināsies fluorescence. Eksponenciālā fāze sākās pēc tam, kad paraugs sasniedz tādu daudzumu, lai tā fluorescence izteikti pārsniegtu fonu un beidzās līdz ar plato fāzes sākumu. Nepieciešams iegūt amplifikācijas līkni un atrast ciklus, pie kuriem tā sasniedz noteiktu sliekšņa vērtību, ko izvēlās analizējot datus un izmanto visiem paraugiem vienādi.

Reālā laika PĶR amplifikācija tiek veikta izmantojot Applied Biosystems® 7500 PĶR sistēmu (Thermo Fisher Scientific, ASV) ar standarta amplifikācijas parametriem SYBR green reakcijām (4. tabula). Reakcijas sapilina 96 bedrīšu qPCR platēs, 14  $\mu$ L tilpumos, katrā reakcijā iekļaujot 1x SYBR® Green master mix, 100 nM gēna specifisko tiešo praimeru, 100 nM specifisko gēna reverso praimeru, 0.2  $\mu$ L cfDNS. Visas reakcijas veic divos tehniskajos atkārtojumos. Ct vērtības aprēķina pie  $\Delta Rn=0,3$  sliekšņa. *EGFR* praimeru: Tiešais: AATCAGTTGGTCACCTTGCTC; Reversais: TCCCCAAATGTCAACCAAGCA).

Reālā laika kvantitatīvā PĶR iekārtas programma.

Table 4

Real time quantitative PCR device program.

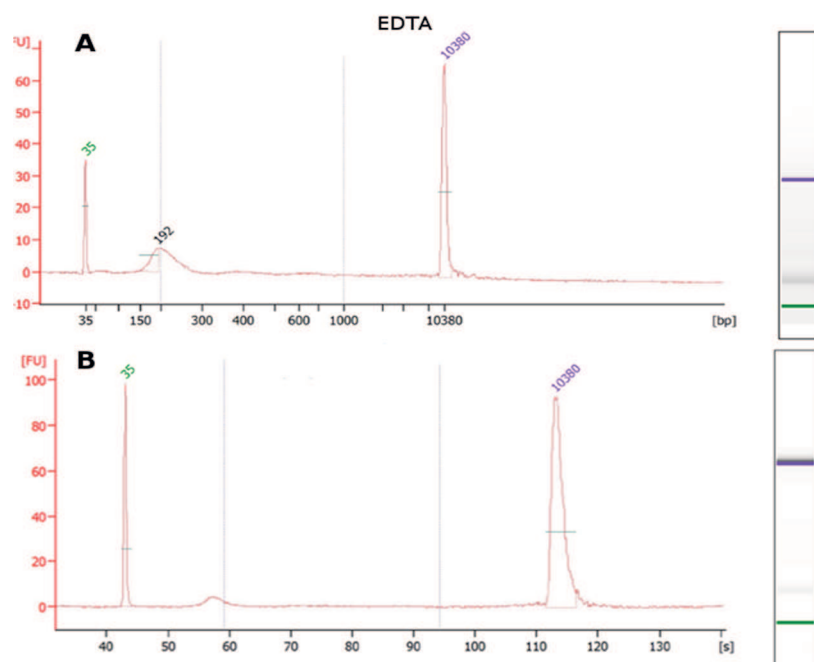
Solis	Iestatījumi (1.6°C/s ramp-rate)
1	50°C, 2'
2	95°C, 10'' 1x
3	95°C, 15'' 40x 60°C, 1'
Melting curve analysis	YES

Analīze: Baseline: 330 000.

## 4. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

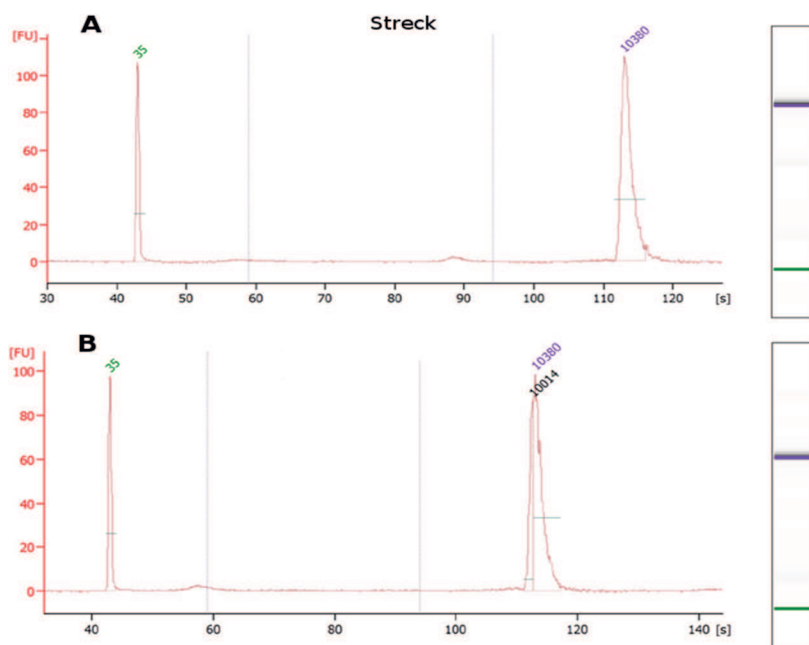
### 4.1 Šūnu brīvās DNS asins stobru izvēle

Lai izvēlētos piemērotākos asins paraugu savākšanas stobrus cfDNS izolēšanai, tika salīdzināti 3 dažādi stobri –EDTA vakutaineri (Vacutainer blood collection tubes, kat.nr. 366643, BD, ASV), Streck (Streck Cell-Free DNA Collection Tube, kat.nr ) un Roche (Cell-Free DNA collection Tube, kat.nr. 07832397001, Roche, Šveice). Asins paraugi tika paņemti no diviem veseliem cilvēkiem un 15 min laikā no paņemšanas brīža tika atdalīta plazma. No 1mL EDTA, Streck un Roche stobru plazmas paraugiem uzreiz pēc tās izdalīšanas tika izdalīta cfDNS, pārējā plazma tika iesaldēta pie -70°C. Tika veikta izdalītās cfDNS raksturošana uz Agilent 2100 bioanalizatora plazmai, kas tika izdalīta no EDTA, Streck un Roche asins stobriem, lai novērtētu vai ir iespējams detektēt cfDNS uz Agilent 2100 un vai plazmas sasaldēšana ietekmē izdalīto cfDNS daudzumu, analizējot fragmentus garumā no 80 līdz 300 bāžu pāriem. Bioanalizatora rezultāti parādīja, ka cfDNS tika atrasts tikai vienā tūlītējas apstrādes EDTA asins stobra plazmas izdalītajā paraugā, kas parādīja, ka pārējos paraugos cfDNS nav izdalīta, tā ir ļoti zemas koncentrācijas un metode ir nepietiekami jutīga, lai analizētu saldētās plazmas cfDNS (10., 11. un 12. attēls). Šādus ‘tukšus’ mērījumus var redzēt Streck un Roche gadījumā gan plazmas tūlītējas apstrādes, gan saldētas plazmas gadījumā. Balstoties uz šo informāciju, tika veikta qPCR analīze.



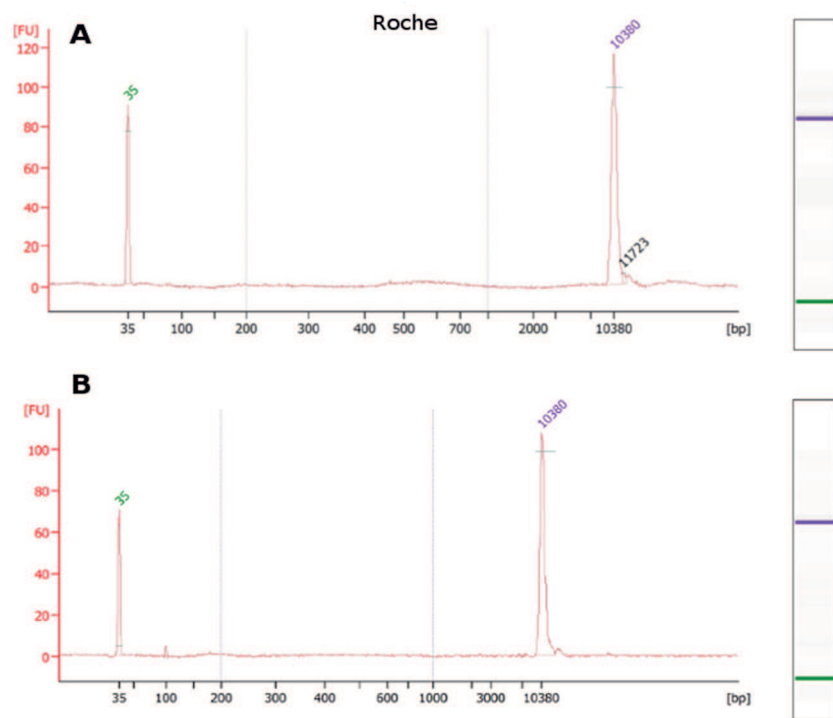
10. attēls – Izdalītā cfDNS daudzuma analīze no EDTA asins savākšanas stobra, izmantojot Agilent 2100 bioanalizatoru. A – Analīze no tūlītējas plazmas cfDNS parauga. B- Analīze no sasaldētas plazmas cfDNS parauga.

Figure 10 – Extracted cfDNA yield analysis from a EDTA blood collection tube, using Agilent 2100 bioanalyzer. A- Analysis of cfDNA extracted from fresh plasma sample. B- Analysis of cfDNA extracted from a frozen plasma sample.



11. attēls – Izdalītā cfDNS daudzuma analīze no Streck asins savākšanas stobra, izmantojot Agilent2100 bioanalizatoru. A – Analīze no tūlītējas plazmas cfDNS parauga. B- Analīze no sasaldētas plazmas cfDNS parauga.

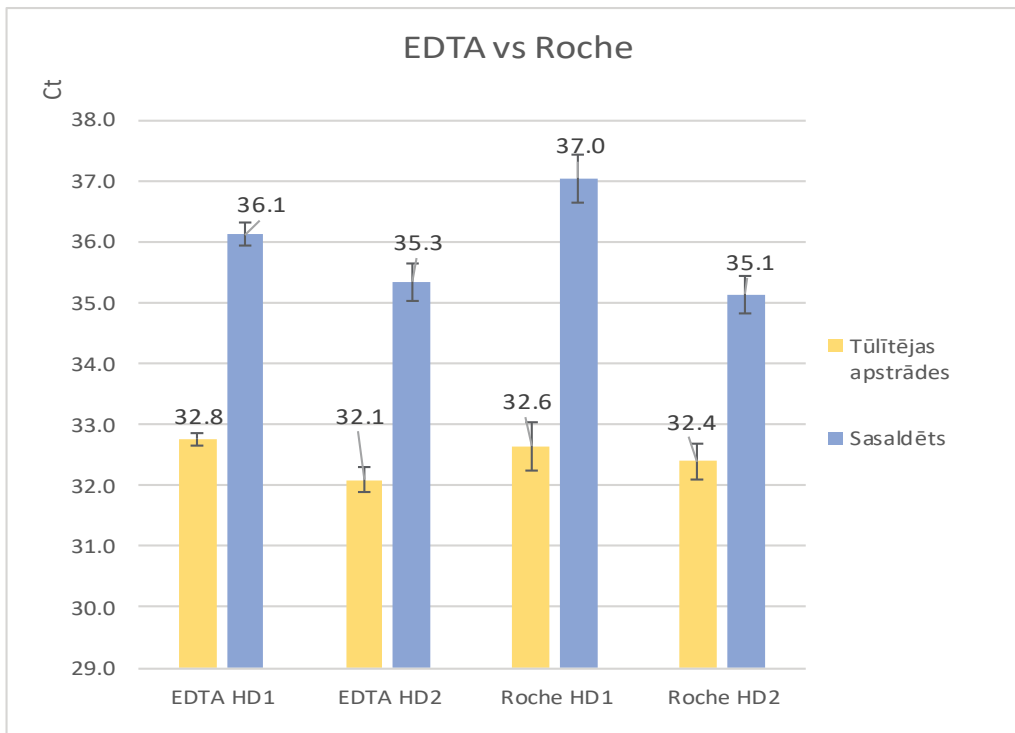
Figure 11 – Extracted cfDNA yield analysis from a Streck blood collection tube, using Agilent2100 bioanalyzer. A- Analysis of cfDNA extracted from fresh plasma sample. B- Analysis of cfDNA extracted from a frozen plasma sample.



12. attēls – Izdalītā cfDNS daudzuma analīze no Roche asins savākšanas stobra, izmantojot Agilent2100 bioanalizatoru. A – Analīze no tūlītējas plazmas cfDNS parauga. B- Analīze no sasaldētas plazmas cfDNS parauga.

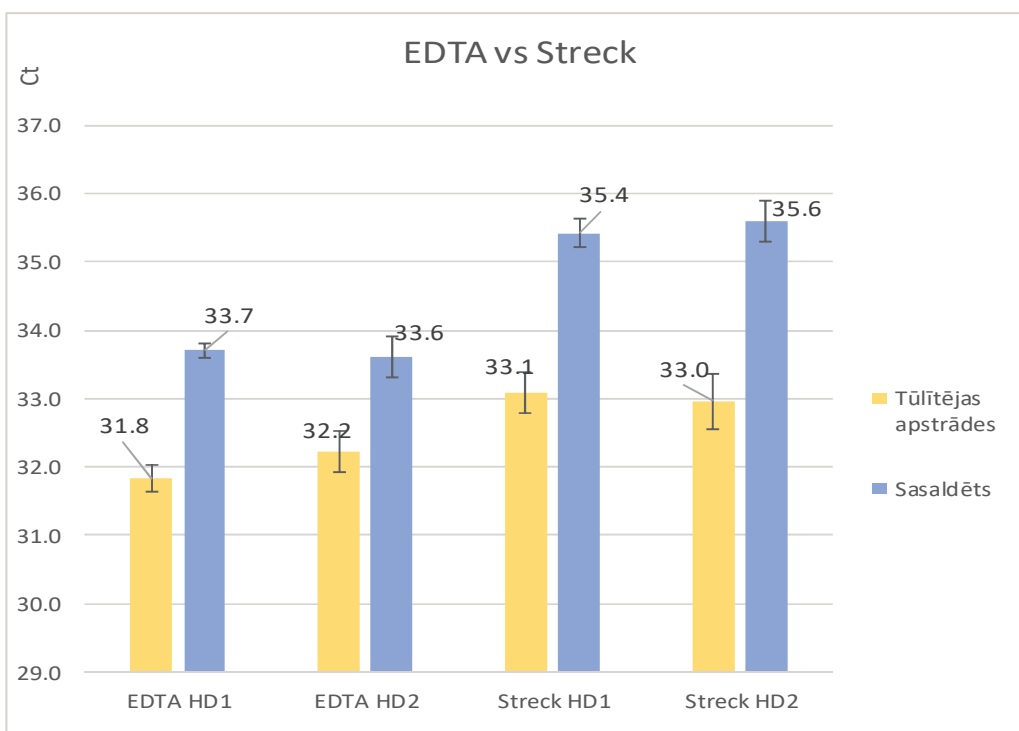
Figure 12 – Extracted cfDNA yield analysis from a Roche blood collection tube, using Agilent2100 bioanalyzer. A- Analysis of cfDNA extracted from fresh plasma sample. B- Analysis of cfDNA extracted from a frozen plasma sample.

Tika veikta kvantitatīvā PCR, lai noteiktu vai kāds no asins stobriem ir izteikti labāks cfDNS daudzuma saglabāšanā, kā arī izvērtētu plazmas sasaldēšanas izraisītos cfDNS zudumus. Rezultāti liecina par to, ka nav lielas starpības cfDNS saglabāšanā starp EDTA asins stobriem un specifiskajiem cfDNS stobriem, taču ir novērota liela starpība starp tūlītējas apstrādes asins stobru plazmas cfDNS un sasaldētas plazmas cfDNS (13. un 14. attēls). Sasaldējot plazmu tiek iegūti lieli nukleīnskābju zudumi, kas ir novērojami pilnīgi visos cfDNS gadījumos, saldētās plazmas cfDNS paraugu daudzumam pieaugot vēlākajos ciklos, ar aptuveni 1.5-3.5  $\Delta$ Ct. Nav precīzi zināms tieši kāpēc notiek šādi zudumi, taču šie dati liecina par faktu, ka strādājot ar cfDNS analīzi, iegūstot plazmu, to ir jāapstrādā tūlītēji, citādi pēc plazmas atsaldēšanas seko vairākkārtēji cfDNS daudzuma zudumi.



13. attēls – EDTA un Roche asins stobra salīdzinājums cfDNS saglabāšanai, izmantojot qPCR, no diviem veselīgiem donoriem.

Figure 13 – EDTA blood collection tube comparison to Roche in regards to cfDNA preservation, using qPCR.



14. attēls – EDTA un Streck asins stobra salīdzinājums cfDNS saglabāšanai, izmantojot qPCR, no diviem veselīgiem donoriem.

Figure 14 – EDTA blood collection tube comparison to Streck in regards to cfDNA preservation, using qPCR in two healthy donors.

## 4.2 Pētījumā iesaistītie pacienti

Šī darba ietvaros tika konstruētas četru pacientu (5.tabula) audu biopsiju audzēja DNS bibliotēkas un asins šūnu genomiskās DNS bibliotēkas.

5. tabula

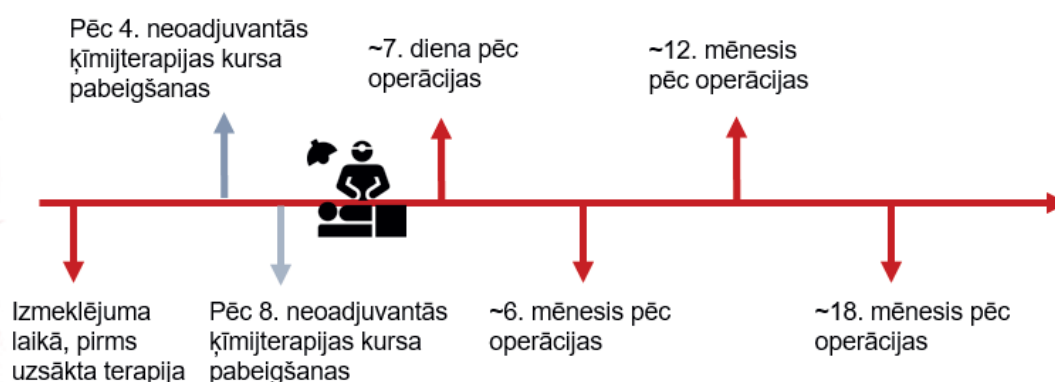
Četru, šajā darbā iesaistīto krūts vēža pacientu apraksts.

Table 5

Description of four breast cancer patients involved in this study.

Pacients	Stadija	ER, %	PR, %	HER2	E-kadh	Krūts vēža veids
1	T3N2M0G2	96	5	2+	+	Invazīva ductāla karcinoma Luminal B
2	T2N2M0G2	95	10	3+	+	Invazīva ductāla karcinoma
3	T3N1M0G3	0	0	3+	-	DCIS
4	T2N2M0G2	0	0	3+	+	Invazīva ductāla karcinoma

Asins paraugi tika ņemti sekojošajos laika punktos - pirms neoadjuvantās ķīmijterapijas, pēc ceturtā neoadjuvantā ķīmijterapijas kursa, pēc astotā neoadjuvantā ķīmijterapijas kursa, septiņas dienas pēc operācijas, seši mēneši pēc operācijas, 12 mēneši pēc operācijas un 18 mēneši pēc operācijas (15. attēls). Vispirms no biopsiju paraugiem (FFPE) tika izdalīta DNS, no tā tika būvētas mērķētās sekvenēšanas bibliotēkas, tai tiek veikta fragmenta garuma selekcija un tad paraugi tika senvecēti. No šī paša pacienta asins parauga tika izdalīta leukocītos esošā genomiskā DNS, kas tiek izmantota salīdzināšanai kā veselo audu norma.



15. attēls – Pacienta cfDNA asins paraugu savākšanas laika punkti, klīniskās notikumu dinamiskai izvērtēšanā.

Figure 15 – Time points of cfDNA blood sample collection for dynamic clinical event analysis.

### 4.3 Sekvencēšana

MiSeq ir integrēta iekārta, kas veic klonu amplifikāciju, DNS sekvencēšanu un datu analīzi ar *base calling*, *alignment*, *variant calling* un *reporting* vienā izmantošanas reizē. MiSeq iekārtā sekvencēšana tiek veikta reģistrējot DNS pavedienu sintēzi parauga kūlīšos, kas ir piestiprināti *flowcell*. Katrs bāžu pāris atbrīvo fluorescēto krāsu, ko ierosina diodes lāzeri (530nm un 660nm) un šī fluorescēnce tiek detektēta izmantojot divas digitālas kameras. Sekvencēšanā tiek pielietoti unikālie molekulārie identifikatori (UMI). UMI ir īsas sekvenču, kas iezīmē individuālas molekulas sākotnējā paraugā un ļauj atšķirt, kā arī kvantificēt unikālus DNS fragmentus. UMI palīdz iegūt visaugstāko sekvencēšanas precizitāti un kļūdu labojumu. Vislielākais UMI pluss DNS-bāzētos pētījumos ir kļūdu labošana un viltus pozitīvo lasījumu skaita samazināšana. Īstie duplikāti var tikt izmantoti, lai noteiktu zemas frekvences mutācijas. Datu analīzes, kuras iekļauj UMI pielietošanu var uzticamāk noteikt kopiju skaita variācijas un, kopumā, UMI pielietošana sekvencēšanā uzlabo metodes jutīgumu un specifiskumu (Anonymous 2020).

Lai iegūtu 1000x pārklājumu katrā paraugā, tika aprēķināts cik paraugus varēs iekļaut vienā 150 ciklu Miseq *flowcell*, izmantojot Illumina pārklājuma kalkulatoru.

### 4.4 Audos atrasto mutāciju analīze

Pēc sekvencēšanas datu apstrādes algoritma, tika iegūti sekojošie dati (6.tabula):

6. tabula

Sekvencēšanas datu raksturojums.

Table 6

Sequencing data characterization.

Pacients un paraugs	Kopīgie lasījumi pirms filtrēšanas, skaits	Kopīgie lasījumi pēc filtrēšanas, skaits	Kartēti pēc GRChr38, skaits	Kartēti cilvēka genomā, %	Vidējais pārklājums pēc filtrēšanas, bp	Pēc UMI deduplikācijas, skaits
FFPE 1	787681	754138	685968	90.96	122.11	123389
FFPE 2	869037	809440	748193	92.43	118.11	131579
FFPE 3	1169715	1111143	1059947	95.39	120.11	193937
FFPE 4	2490635	238261	2275368	95.50	109.10	485708
gDNS 1	1032207	974972	940698	96.48	124,11	182874
gDNS 2	1062116	991064	921387	92.97	122,11	181690
gDNS 3	2617034	2485554	2354484	94.73	123,11	418351
gDNS 4	2980527	2759732	2687877	97.40	121,11	498046

Apskatot pirmā pacienta datu vizualizāciju (1. pielikums), tiek novērots, ka viena lasījuma ietvaros ir atrastas pat septiņas mutācijas, kas liek domāt, ka iespējams tiek nolasīts pseidogēns vai visdrīzāk ir notikusi parauga kontaminācija ar svešu DNS. Apskatot asins šūnu DNS bibliotēkas datus, šādu variāciju nevar novērot paraugā, kas ir ticis apstrādāts Biomedicīnas pētījumu un studiju centra laboratorijā, taču FFPE parauga variantā, kas sagatavots slimnīcā tā ir redzama. Šis fakts liek secināt, ka visdrīzāk kontaminācija ir notikusi slimnīcā, pirms paraugs ir bijis nogādāts laboratorijā. Ņemot vērā, ka slimnīcā patologs audu paraugus apstrādā gandrīz tikai un vienīgi tālākai histoloģiskai analīzei un parauga apstrāde netiek speciāli piemērota tālākai ģenētiskā materiāla analīzei, tas parāda nopietnu problēmu klīnisko paraugu kvalitātes nodrošināšanā.

Iegūtos sekvencēšanas datus pēc apstrādes algoritma ir nepieciešams filtrēt, atlasot pēc vērtību sliekšņiem (*cut-off*). Pirmais pēc kā tiek atlasītas mutācijas ir pēc *supporting* lasījumu skaits, kuros mutācija ir atrasta. Tika atlasītas mutācijas, kurās ir vismaz četri lasījumi. Nākamais pēc kā tika atlasītas mutācijas ir to pārklājums atkarībā no mutācijas frekvences. Ja mutāciju frekvence ir virs 30%, tad tika atlasītas mutācijas, kuru pārklājums ir >40 lasījumiem pēc deduplikācijas, taču mutācijām ar frekvenci zem 30% tika atlasītas mutācijas būtu ar pārklājumu vismaz 100 vai vairāk pēc deduplikācijas. Balstoties uz faktu, ka ir aizdomas par kontamināciju un daudzām no šīm mutācijām ir augsta frekvence populācijā, tika atlasītas tikai tās mutācijas, kuras ir populācijā sastopamas retāk par 0.1%. Tika apskatītas mutācijas ar frekvenci virs 3%. Pēc datu atlasē palika somatiskās mutācijas, kurām tiek raksturota bioloģiskā nozīme.

#### 4.4.1 Pirmais patients

Pirmā pacienta audu parauga DNS sekvencēšanas rezultāti parāda palielinātu kopiju skaitu sešos gēnos: *MDM2*, *CCND1*, *FGF19*, *FGF4*, *FGF3* un *EGFR* (7. tabula).

Gēni, ar kopiju skaita variācijām 1. pacientam.

Table 7

Genes with copy number variation in the first patient.

Gēns	Hromosoma	Sākums	Beigas	log2
<i>MDM2</i>	12	69202252	69233635	1.69675
<i>CCND1</i>	11	69456076	69466130	1.38374
<i>FGF19</i>	11	69513270	69518806	1.38374
<i>FGF4</i>	11	69588093	69590181	1.38374
<i>FGF3</i>	11	69625041	69631174	1.38374
<i>EGFR</i>	7	55209972	55273315	1.22093

Pēc augstāk minētā datu apstrādes *cut-off* nebija palikusi neviena mutācija, kas atbilst definētajiem kritērijiem.

#### 4.4.2 Otrais pacients

Otrā pacienta audu parauga DNS sekvencēšanas rezultāti parāda palielinātu kopiju skaitu: *MYC*, *ERCC4*, *ZNF703*, chr 8:37.6 Mb un *FGFR1* (8. tabula)

8. tabula

Gēni, ar kopiju skaita variācijām 2. pacientam.

Table 8

Genes with copy number variations in the second patient.

Gēns	Hromosoma	Sākums	Beigas	log2
<i>MYC</i>	8	128748795	1,29E+08	1.73412
<i>ERCC4</i>	16	14013974	14042216	1.66785
<i>ZNF703</i>	8	37553540	37556162	1.35367
chr8:37.6Mb	8	37556969	37557092	1.35367
<i>FGFR1</i>	8	38271093	38318677	1.35367

Pēc augstāk minētā datu apstrādes *cut-off* tika atlasītas divas variācijas. No tām viena ir aminoskābju ietekmējošas (*missense variation*) ar vidēju ietekmi (*MODERATE*) un otra ir STOP izraisošā mutācija, kas ir smagi (*HIGH*) ietekmējoša mutācija (9.tabula). Abas no mutācijām atrodas eksonā.

9. tabula

Atrastās somatiskās mutācijas pēc cut-off atlasē otrajam krūts vēža pacientam.

Table 9

Somatic mutations after cut-off filtering in the second breast cancer patient.

Hr	Pozīcija	Gēns	Mutācijas frekvence, %	Pārklājums pēc deduplikācijas	Mut.veids	AS	Kodons	Ietekme	COSM
3	178952074	PIK3CA	62.75	51	mis_var	M/I	atG/atA	MODE	COSM29313,COSM419700,COSM446027,COSM773,COSM94984,COSM94985
7	6018323	PMS2	6.25	124	stop	Q/*	Cag/Tag	HIGH	-

#### 4.4.3 Trešais pacients

Trešā pacienta audu parauga DNS sekvencēšanas rezultāti parāda palielinātu kopiju skaitu četros gēnos: *PCGF2*, *ERBB2*, *RAD51C* un *BRIP1*.

10. tabula

Gēni, ar kopiju skaita variācijām 3. pacientam.

Table 10

Genes with copy number variations in the third patient.

Gēns	Hromosoma	Sākums	Beigas	log2
<i>PCGF2</i>	17	36891461	36896691	2.57555
<i>ERBB2</i>	17	37855790	37884306	2.57555
<i>RAD51C</i>	17	56811449	56811617	1.65867
<i>BRIP1</i>	17	59760649	59938918	1.65867

Pēc augstāk minētā datu apstrādes *cut-off* tika atlasīta tikai viena variācijam kura bija sinonīma ar zemu (*LOW*) ietekmi gēnā un tā atrodas eksonā (11. tabula).

11. tabula

Atrastās somatiskās mutācijas pēc *cut-off* atlasē trešajam krūts vēža pacientam.

Table 11

Somatic mutations after cut-off filtering in the third breast cancer patient.

Hr	Pozīcija	Gēns	Mutācijas frekvence, %	Pārklājums pēc deduplikācijas	Mut.veids	AS	Kodons	Ietekme	COSM
6	152658027	SYNE1	4.94	121	syn_var	R	agG/agA	LOW	COSM3859476,COSM3859477,COSM3859478,COSM3859479,COSM3859480

#### 4.4.4 Ceturtais pacients

Ceturtā pacienta audu parauga DNS sekvencēšanas rezultāti parāda palielinātu kopiju skaitu tikai vienā gēna – *ERBB2*.

12. tabula

Gēni, ar kopiju skaita variācijām 4. pacientam.

Table 12

Genes with copy number variations in the forth patient.

Gēns	Hromosoma	Sākums	Beigas	log2
<i>ERBB2</i>	17	37855790	37884306	2.50601

Pēc augstāk minētā datu apstrādes *cut-off* tika atlasītas 39 variācijas (2. pielikums). No tām 10 ir aminoskābju ietekmējošas (*missense variation*), 15 ir intronu varianti, 6 ir sinonīmas, divas ir downstream gēnu varianti, divas ir *inframe* insercijas, divas ir STOP izraisošas, viena ir 5' UTR variants un viena ir splaisinga saita mutācija. No visām atlasītajām mutācijām 3 smagi ietekmē gēna funkciju, no kurām divas ir STOP izraisošas mutācijas, kā arī viena splaisinga saita mutācija. Vidēja ietekme ir 12 mutācijām, kuras gandrīz visos gadījumos ir aminoskābju ietekmējošas mutācijas (*missense*), neskaitot divas *inframe* insercijas. Modificējošas mutācijas ir 18 gadījumos, no kuriem lielākā daļa ir intronu varianti, taču divas mutācijas ir *downstream* gēnu varianti un viens 5'UTR variants. Zemas ietekmes mutācijas ir novērotas 6 gadījumos, no kuriem visas ir sinonīmas, aminoskābju neietekmējošas mutācijas. Izslēdzot sinonīmās mutācijas, visvairāk mutācijas bija sekojošajos gēnos – *CDH1*, *MUC16* un *KCNN3*. No atlasītajām mutācijām 21 atrodas eksonā un 16 atrodas intronā.

#### 4.5 Personalizētas medicīnas metodes krūts vēža terapijas izvēlei

Personalizētās, jeb precīzijas medicīnas viena no galvenajām pielietotajām metodēm ir šķidro biopsiju analīze. Tiek noteiktas ģenētiskās izmaiņas audzēja audos un pēc tām tiek analizētas šķidrās biopsijas, salīdzinot tās savā starpā vai viena šķidrās biopsijas veida ietvaros, analizētas tās izmaiņas. Ģenētiskas izmaiņas ir novērojamas gandrīz katrā audzējā veidā, taču to variācija apgrūtina spēju pielāgot tiem terapiju. Krūts vēža gadījumā, tādas izmaiņas kā *BRCA* un *PIK3CA* mutācijas pierāda, ka to analizēšana potenciāli var palīdzēt terapijas izvēlē. Taču ar atsevišķu mutāciju analīzi nepietiek, lai pielāgotu terapiju individuālam pacientam un ir nepieciešams multigēnu panelis. Lai ieviestu NGS gēnu mutāciju paneļus klīniskajā praksē, ir nepieciešams tos validēt un ar zemas jutības testu,

tas nav iespējams, līdz ar to ir nepieciešamas zemākas detekcijas sliekšņa iekārtas, piemēram ddPCR. Mutāciju atrašana var sniegt informāciju ne tikai par audzēja subtipu un pielāgoto terapiju, bet arī šo mutāciju analizēšana klīnisko notikumu gaitā var sniegt ieskatu par to, kā noris terapijas process, vai audzējs progresē un vai audzējs atgriežas pēc operācijas. Ar šo iekārtu var veikt atsevišķu mutāciju analīzi, taču nav iespējams noteikt jaunas mutācijas.

Krūts vēža subtipu klasifikācija bieži neatbilst reālajam audzēja profilam, līdz ar to pielietotā terapija var nebūt atbilstoša un rezultēties ar smagām blakus parādībām, līdz terapija tiek pielāgota. Ir izveidoti vairāki multigēnu paneli, pēc kuriem ir iespējams noteikt audzēja atgriešanās risku, izmantojot parafīna blokos ieslēgtu audu paraugus. Pašlaik, vispazīstamākie no šiem testiem ir MammaPrint (Anonymous 2020); PAM50 (Anonymous 2019); Oncotype DX (Anonymous 2019).

- **MammaPrint**: Tests ir balstīts uz 70 gēnu microarray (MA) testu, pēc kura tiek veikta audzēja atgriešanās riska izvērtēšana. Tiek veikts sievietēm, kurām ir agrīns, ne-invazīvs audzējs, kas nav izplatījies līdz limfmezgliem vai ir izplatījies līdz 3 vai mazāk limfmezgliem. Gēnu ekspresijas analīze spēj prognozēt vai audzējs izplatīsies tālāk organismā un vai audzējs pēc remisijas atgriežas. Ja rezultāti liecina par audzēja atgriešanos, tad laicīgi tiek sākota ķīmijterapijas pielietošana (Badve 2018).
- **PAM50**: Pārsaukts firmas nosaukumā Prosigna®. Tas ir RT-qPCR analīzes tests, kas ir balstīts uz 50 gēnu ekspresijas analīzi. Prat et al. apskata pētījumā ir analizētas publikācijas, salīdzinot imunohistoķīmijas (IHC) standarta 7 grupu klasifikāciju ar PAM50 klasifikāciju (Prat, Pineda et al. 2015). Dati liecina, ka nav iespējams abas klasifikācijas metodes uzskatīt par vienlīdzīgām un bieži patiesais audzēja profils tiek noteikts kļūdaini. *Intrinsic* subtipi daudz precīzāk noraksturo sadalījumu par standartā pielietotajiem 4-5 marķieriem un PAM50 sistēmas izstrādes procesā tika atrasta saistība, ka bez kļūdām nav iespējams precīzi noteikt *intrinsic* subtipu, ja tiek pielietoti mazāk kā 50 marķieri (Prat et al. 2012).
- **Oncotype DX**: Viena no visatzītākajām metodēm un tiek uzskatīta kā standarts audzēja gēnu ekspresijas profila raksturošanā AJCC atbalstītā klasifikācijā. Tā ir balstīta uz 21 gēna ekspresijas izvērtēšanu. Kombinēta katra gēna ekspresija veido formulu, kas izsaka *Oncotype DX* rādītāju. Tāpat kā iepriekš minētās metodes, tā balstās uz RT-PCR un tiek izteikts 'Recurrence score', jeb atgriešanās risks skalā no 0-100 agrīna krūts vēža un DCIS gadījumā.

Rezultējošais rādītājs noraksturo krūts audzēja iespējamību atgriezties, izsaka kā audzējs reaģēs uz ķīmijterapiju, tāpat arī izvērtē radiācijas terapijas efektivitāti, ja tiek ārstēts DCIS.

Sievietēm, kuras ir vecuma grupā 50 vai jaunākas, '*Recurrence score*':

- a) **0-15** tiek izvērtēts kā zems vēža atgriešanās risks un ķīmijterapijas pielietošana izsauks smagākas blakusparādības, nekā nesīs terapeitisku efektu;
- b) **16-20** tiek izvērtēts kā vidējs audzēja atgriešanās risks. Ķīmijterapija visdrīzāk neattaisno sekojošās blakusparādības.
- c) **21-25** tiek izvērtēts kā vidējs audzēja atgriešanās risks. Ķīmijterapija visdrīzāk attaisno sekojošās blakusparādības.
- d) **26-100** tiek izvērtēts kā augsts audzēja atgriešanās risks, kurā ķīmijterapija ir nepieciešama un sekojošās blakusparādības nav nopietnākas par terapijas neuzsākšanu.

Taču sievietēm, kuras vecuma grupā virs 50 gadiem, '*Recurrence score*':

- a) **0-25** tiek izvērtēts kā zems audzēja atgriešanās risks. Ķīmijterapija visdrīzāk neattaisno sekojošās blakusparādības.
- b) **26-100** tiek izvērtēts kā augsts audzēja atgriešanās risks. Ķīmijterapija visdrīzāk attaisno sekojošās blakusparādības.

Pēc 12 gēnu ekspresijas analīzes tiek izvērtēts arī staru terapijas pielietošanas risks DCIS ārstēšanai, '*Recurrence score*':

- a) <39: Zema DCIS atgriešanās iespējamība. Staru terapijas blakusparādības neattaisno terapijas pielietošanu.
- b) 39-54: Vidēja DCIS atgriešanās iespējamība. Nav zināms vai staru terapijas blakusparādības attaisno to pielietošanu.
- c) >54: Augsta DCIS atgriešanās iespējamība. Staru terapijas blakusparādības attaisno terapijas pielietošanu.

*Oncotype DX* rādītājus izmanto kombinācijā ar citiem parametriem, piemēram audzēja izmēru, hormonu receptorus un vecumu, lai izvēlētos vispiemērotāko terapijas izvēli.

## 4.6 Potenciāls agrīnā krūts vēža diagnostikā

Ir veikti vairāki pētījumi, kuros ir analizēta somatisko mutāciju noteikšana audzēja šūnu DNS un šo pašu mutāciju noteikšana cfDNS izmantojot NGS (Iwama et al. 2017). No 45 audzēja audu mutācijām tādos gēnos kā *EGFR*, *TP53*, *CTNNB1* šūnu brīvajā DNS tika atrastas 30 mutācijas, piešķirot šūnu brīva DNS somatisko mutāciju noteikšanai 66.7% jutīgumu izmantojot NGS.

Vairāki pētījumi ir parādījuši, ka krūts vēža pacientiem ir novērots palielināts cfDNS daudzums, salīdzinājumā ar veselajām kontrolēm, izvirzot cfDNS daudzumu kā biomarkieri audzēja diagnostikai, taču *Schwarzenbach et al.* atrada, ka cfDNS daudzums ir palielināts arī pacientiem ar labdabīgiem krūts veidojumiem, tādējādi apgrūtinot krūts vēža diagnostiku (*Schwarzenbach et al.* 2011). *Agostini et al.* parādīja, ka cfDNS fragmenti, kas nāk no audzēja šūnām nekrozes rezultātā ir ievērojami lielāki, salīdzinājumā ar cfDNS fragmentiem, kas izceļas no veselu pacientu šūnām apoptozes rezultātā (*Agostini et al.* 2012). Tāpat *Agostini et al.* parādīja, ka audzēja cfDNS fragmenti, kas sastāv no 247 bāžu pāriem (ALU247) bija atrodami daudz lielākā skaitā vēža pacientiem un statistiski būtiski pēc tiem varēja atšķirt vēža pacientus no veseliem. ALU247 bija ievērojami lielāks arī 11 pacientiem ar limfmezglu metastāzēm, salīdzinājumā pret 22 pacientiem, kuriem nebija slimība skārusi limfmezglus. Papildus tam, četros polimorfiskos marķieros tika novērots cfDNS heterozigotātes zudums reģionā 13q31-33 D13S159, D13S280 un D13S282, kā arī *PTEN* reģionā 10q23.31 D10S1765, kas korelēja ar limfmezglu metastāžu esamību (*Agostini, Enzo et al.* 2012). Ārpus cfDNS fragmentu garuma un heterogenitātes zuduma, ir novērotas arī izmaiņas atsevišķu nukleotīdu polimorfismā, salīdzinājumā ar normālu leukocītu DNS (*Shaw et al.* 2012). *Board et al.* parādīja, ka analizējot metastatisku krūts vēža pacientu ctDNS, tika atrasti 80% no *PIK3CA* mutācijām, kuras tika atrastas arī audzēju audos, pierādot, ka ir pamatojums uzskatīt, ka ctDNS ir spēja reprezentēt audzēja audos atrastas mutācijas, taču mutācijas nevarēja detektēt lokalizētos audzējos (*Board et al.* 2010). *Beaver et al.* pētījumā 14 no 15 pacientiem ar ne-metastatisku krūts vēzi tika atrastas tās pašas *PIK3CA* mutācijas ctDNS pirms operācijas, izmantojot ddPCR (*Beaver et al.* 2014). Pētījumi par ctDNS detekcijas spēju parāda, ka pielietoto metožu jutīgums ir ārkārtīgi atšķirīgs un tas ir nepietiekams ctDNS iekļaušanā klīniskajā krūts vēža skrīningā. Ir parādīts, ka *ESR1* mutācijas ir iespējams noteikt ctDNS 6.7 mēnešus pirms klīniskās audzēja progresijas, sniedzot iespēju laicīgi uzsākt terapeitisku iejaukšanos (*Fribbens et al.* 2018). Meta analīzes pētījumā, kurā tika analizēti 69 ctDNS pētījumi, tika atrastas visbiežāk sastopamās mutācijas gēnos *TP53*, *PIK3CA* un *ESR1* (38%, 27% un 32%,

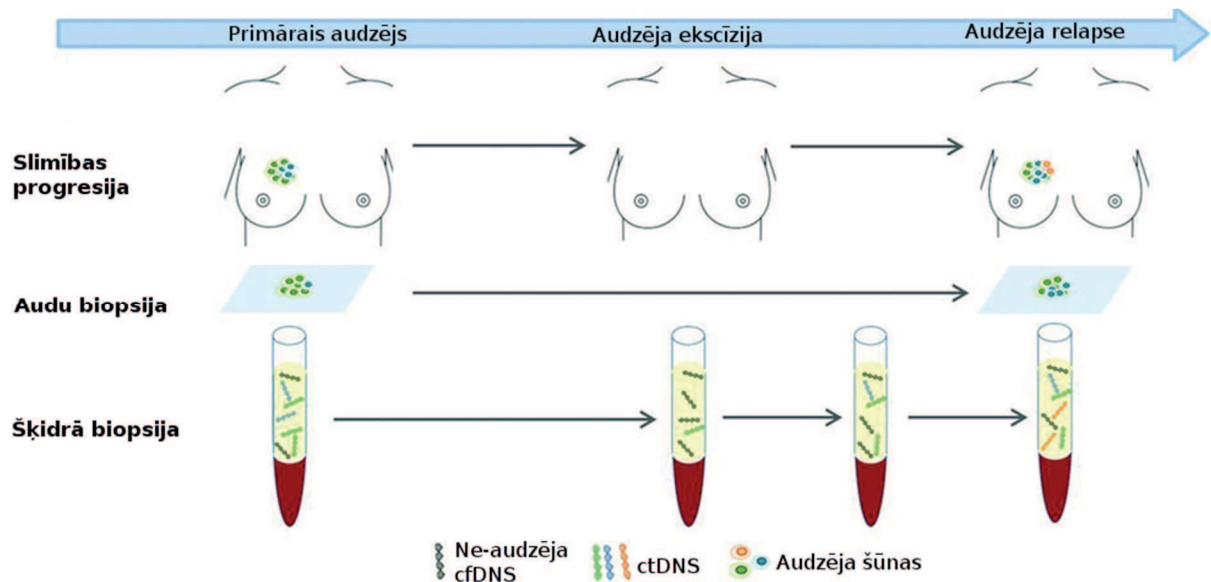
attiecīgi) un tika secināts, ka frekvences ir pārāk zemas, lai tās varētu pielietot ikdienas klīniskajā krūts vēža skrīningā. Papildus tam nav zināmas vadlīnijas kā rīkoties, ja tiek atrasta atlasīto gēnu mutācija ļoti agrīnā krūts vēža pacienta gadījumā, kas liecina par audzēja attīstību, taču klīniski vai radioloģiski nav parādījusies neviena pazīme par audzēja attīstību. Tāpat, tāda gēna kā TP53 mutācijas ir novērojamas vairāku audzēja veidu gadījumos un unikāli neliecina par tieši krūts vēža attīstības pirmsākumiem (Lee et al. 2018). Lai atrisinātu šo problēmu, Cohen et al. apraksta testu, kas iekļautu ne tikai ctDNS somatisko mutāciju analīzi, bet arī plazmā esošo proteīnu biomarkieru analīzi, lai precīzāk varētu noteikt audzēja primāro atrašanās vietu.

Ir atrasta sakarība, kas liecina, ka pacientiem ar audzējiem, kas ir mazāki par 10 mm asinsritē nav atrodams ctDNS pietiekamā daudzumā, lai pēc tā varētu veikt agrīnu diagnostiku ar pašlaik pieejamām metodēm (Fiala and Diamandis 2019).

Konkrētu mutāciju detektēšana pašlaik vēl nav iespējama, jo nav izveidotas diagnostiskās iekārtas ar pietiekami augstu jutību un visas cfDNS sekvencēšana pašlaik ir ļoti maz pētīta un pielietota, jo tā ir tehniski grūti izpildāma metode gan saistībā ar bibliotēku konstruēšanu, gan saistībā ar augstām sekvencēšanas izmaksām.

#### **4.7 Potenciāls terapijas efektivitātes un atgriešanās riska izvērtēšanā**

Pirms veic audzēja ekscīziju, pacientu asinsritē ir novērojams ctDNS. Pēc audzēja operācijas, klīniskie simptomi var pazust un neparādīties ļoti ilgu laiku, taču audzēja specifiskais DNS var tikt detektēts cirkulācijā ilgu laika periodu pirms audzēja klīnisko pazīmju izpausmes (16. attēls) (Heitzer et al. 2015).



16. attēls – Šķidrās biopsijas pielietošana terapijas atbildes un rezistences dinamiskā novērošanā. Teorija, ka pēc ctDNS var monitorēt audzēja atgriešanās risku. Attēls pielāgots balstoties uz (Heitzer, Ulz et al. 2015)

Figure 16 – Liquid biopsies to monitor therapy responses and resistance. Theory describing that tumor relapse can be monitored using ctDNA. Image was adapted based on (Heitzer, Ulz et al. 2015)

Mutācijas *ESR1* gēnā, kas kodē estrogēna receptoru  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) tiek atrasts pacientos, kuriem tiek pielietota endokrīnā terapija. Primārajos audzējos *ESR1* mutācijas tiek atrastas ļoti mazā skaitā vai netiek atrastas nemaz, taču metastatisku audzēju gadījumā skaits ir ievērojami augstāks. Ir izvirzīta teorija, ka šīs mutācijas rodas tieši endokrīnās terapijas rezultātā (Li et al. 2013; Jeselsohn et al. 2014). Pacientiem ar *ESR1* mutācijām ir atrasta korelācija ar sliktāku klīnisko iznākumu pielietojot tādus AI kā eksemestāns. Wang et al. pētījumā tika veikta dinamiska ctDNS novērošana klīnisko notikumu gaitā. Trīs no četriem pacientiem, *ESR1* mutāciju frekvence tieši korelēja ar endokrīnas terapijas rezistences veidošanos kā arī slimības progresiju (Wang et al. 2016). Krūts vēža pētījumā, kurā analizēti agrīni audzēji, kuriem novērota audzēja atgriešanās sekojot pēc-operācijas AI terapijai, ctDNS *ESR1* mutācijas netika detektētas pacientiem līdz AI terapijas beigu posmam, taču pie pirmās relapses, 5.3% pacientu tika atrastas *ESR1* mutācijas cirkulējošajā DNS. Metastatisko audzēju terapijas laikā izmantojot AI, 33% pacientiem tika atrastas cirkulējošas *ESR1* mutācijas, taču pacientiem, kuriem tika pielietota AI vietā ķīmijterapija, netika atrasta neviena *ESR1* mutācija, parādot to, ka AI pielietošana metastatisko audzēju ārstēšanā rezultējas ar palielinātu *ESR1* mutāciju skaitu (Allouchery et al. 2018). Citā pētījumā ir parādīts, ka pacientam kuram nav bijusi saskare ar AI terapiju, netiek atrastas *ESR1* mutācijas. Metastatiskiem pacientiem ar ctDNS atrastām *ESR1* mutācijām tika novērtots īsāks laika periods bez audzēja progresijas pēc AI terapijas (korigētais nāves

riska koeficients 3.1, 95% CI), liecinot par to, ka *ESR1* mutācijas tiek asociētas ar rezistenci pret AI terapiju un līdz ar to var tikt izmantotas analizējot terapijas efektivitāti (Schiavon et al. 2015). *ESR1* mutāciju noteikšana ctDNS ir pārāka salīdzinājumā ar primārā audzēja sekvenčēšanu, jo ctDNS var precīzāk reprezentēt relapsējošo / metastatisko audzēju. Spoerke et al. parādīja, ka saistība starp *ESR1*-statusu ctDNS un primārajos audos bija 5%, taču saistība starp *ESR1* statusu un metastatiskajiem audzēja audiem bija ievērojami augstāka - 47% (Spoerke et al. 2016). Pētījumā, kurā tika analizēts *ESR1*-statuss ctDNS un CTCs ER+ metastatiskiem pacientiem, tika pielietota endokrīnā terapija pacientu grupai, kura to saņem pirmo reizi un grupai, kura saņem jau atkārtotu endokrīnās terapijas kursu. No pirmreizējās endokrīnās terapijas pacientu grupas, 11% tika atrastas ctDNS *ESR1* mutācijas, taču otrai, atkārtotai endokrīnās terapijas grupai mutācijas tika atrastas 42%. Analizējot CTCs no šiem pacientiem, netika atrasta korelācija *ESR1* mutācijām starp abām pacientu grupām (Beije et al. 2018). Atrastā korelācija liecina par to, ka sērijveida ctDNS monitorēšanas laikā ir iespējams pēc *ESR1* mutācijām novērot endokrīnas terapijas rezistences veidošanos, kas varētu papildināt esošas terapijas vadlīnijas. Šādu pieņēmumu apstiprina pētījumi, kuros ir parādīts, ka pacientiem ar *ESR1* mutācijām eksemestāna aizvietošana ar fulvestrantu (estrogēna receptora *down-regulator*) vai everolimus (mTOR inhibitors) pievienošana eksemestānam uzlabo laika periodu bez audzēja progresijas (Chandarlapaty et al. 2016; Fribbens et al. 2016; Fribbens, Garcia Murillas et al. 2018).

Pētījumā, kurā apskatīts ctDNS daudzumu un tā mutācijas ir parādīts, ka ctDNS detektēšana asinsritē pēc operācijas tieši korelēja ar audzēja atgriešanos. Visaugstākais ctDNS daudzums ir atrodams TNBC gadījumā, vidējs ERBB+ (HER2/neu) pacientiem un vismazākais skaits ERBB-, ER- audzēju gadījumos. Tāpat ctDNS daudzums korelēja ar lielāku audzēja izmēru un augstāku histoloģisko pakāpi. Tika atrasta tieša saistība visu subtīpu krūts vēža pacientu pēc-operācijas ctDNS detekcijā, asins paraugos, 95.7% pacientu, kuriem audzējs atgriezās. Visaugstākais ctDNS daudzums TNBC gadījumā ir izskaidrojams ar augsto šūnu proliferācijas ātrumu (Garcia-Murillas et al. 2019). ctDNS detekcija pirms jebkādas terapijas uzsākšanas tika asociēta ar augstu riska pakāpi audzēja relapsei, kas ļauj domāt, ka šādu analīzi varētu nākotnē iekļaut klīniskajā skrīningā pirms terapijas uzsākšanas, lai laicīgi pielāgotu atbilstošu terapiju.

QIAGEN 2019. gadā ir patentējuši testu, kas analizē 11 mutācijas *PIK3CA* gēnā, audzēja audos vai plazmā esošajā cfDNS, metastatiska krūts vēža pacientiem 'PIK3CA RGQ PCR Kit'. Ja ar šo testu tiek atrastas gēnu mutācijas pacienta *PIK3CA* gēnā, tad tiek ieteikta specifiska terapija ar PIQRAY® (alpelisib) medikamentu. Šī medikamenta

pielietojums pozitīvi korelē ar veiksmīgu terapeitisko efektu pacientiem, kuriem ir atrastas testā pārbaudītās mutācijas (Anonymous 2019).

## 4.8 Plānotais projekta turpinājums

### 4.8.1 Somatisko mutāciju kandidāti monitoringam

No atlasīto mutāciju saraksta, tika izvēlētas mutācijas, kas būtu piemērotas cfDNS analīzei. Vispirms tika izvēlētas mutācijas, kas bioloģiski nozīmīgākas un tās, kuras der ddPCR analīzei (kas nav insercijas vai delēcijas). Pirmajam pacientam nebija atrodamas mutācijas, kas atbilst sākotnējam cut-off, līdz ar to atlase cfDNS analīzei nav iespējama. Otrajam pacientam tika atlasīta viena no divām mutācijām (13. tabula). Trešajam pacientam tika atlasīta viena mutācija, kas atrasta pēc cut-off, taču tā ir zemas frekvences, sinonīma un iespējams nav pats labākais, taču ir vienīgais kandidāts cfDNS analīzei (11.tabula). Ceturtajam pacientam tika atlasītas piecas somatiskās mutācijas, kuras ir aminoskābju ietekmējošas, iespējami bojājumus izraisošas, taču arī ar zemu mutācijas frekvenci (3.2-5.4%)(14. tabula).

13. tabula

Izvēlētās somatiskās mutācijas cfDNS dinamiskai izsekošanai otrā krūts vēža pacienta gadījumā.

Table 13

Selected somatic mutations for cfDNA dynamic monitoring in the second breast cancer patient.

Hr	Pozīcija	Gēns	Mutācijas frekvence, %	Pārklājums pēc deduplikācijas	Mut.veids	AS	Kodons	Ietekme	COSM
3	178952074	PIK3CA	62.75	51	mis_var	M/I	atG/atA	MODE	COSM29313,COSM419700, COSM446027,COSM773, COSM94984,COSM94985

14. tabula

Izvēlētās somatiskās mutācijas cfDNS dinamiskai izsekošanai ceturtajā krūts vēža pacienta gadījumā.

Table 14

Selected somatic mutations for cfDNA dynamic monitoring in the fourth breast cancer patient.

Hr	Pozīcija	Gēns	Mutācijas frekvence,%	Pārklājums pēc deduplikācijas	Mut.veids	AS	Kodons	Ietekme	COSM
8	38273404	FGFR1	5,41	132	mis_var	Y/F	tAt/tTt	MODE	-
X	70341606	MED12	4,71	158	mis_var	S/R	agT/agA	MODE	COSM4110807,COSM4110808
5	112176008	APC	4,27	182	mis_var	E/K	Gaa/Aaa	MODE	COSM4167225,COSM6196800, COSM7166843
8	38274842	FGFR1	4,21	154	mis_var	G/R	Ggg/Cgg	MODE	-
15	64048793	HERC1	3,23	181	mis_var	K/R	aAg/aGg	MODE	-

#### 4.8.2. Ārpusšūnu vezikulu analīze

Pētījumā tika plānots izdalīt ārpusšūnu vezikulas no pacientu plazmas, raksturot tās uz nanodaļiņu izsekošanas iekārtas, *Western Blot*, elektronu transmisijas mikroskopa, sekvenēt EV RNS bibliotēkas, lai meklētu vai audos atrastās mutācijas var atrast EVs, kā arī monitorēt šo mutāciju izmaiņas klīnisko notikumu gaitā. Sakarā ar reaģentu aizkavēšanos, tehniskām problēmām un globālo COVID19 krīzi, šī pētījuma daļa netika izpildīta. Tāpat, audos atrastās mutācijas tika plānots meklēt cfDNS izmantojot ddPCR un komerciāli pasūtītas Taqman zondes.

EV satura analīze tiek pētīta pēdējos desmit gadus, taču EV ietvertās RNS sekvenēšanas pētījumi, kas apskatītu ģenētiskās variācijas - somatiskās mutācijas, krūts vēža gadījumā nav pētīti. *Lee et al.* pētījumā ir apskatījuši uroteliālā urīnpūšļa karcinomas audos atrastās mutācijas un salīdzinājuši tās ar somatiskajām mutācijām, kuras var atrast šo pašu pacientu urīna paraugu cfDNS kā arī urīna eksosomu DNS (exoDNS). No atrastajām 17 somatiskajām mutācijām, 14 bija atrodamas cfDNS un 12 no tām bija atrodamas exoDNS, parādot, ka EV ir potenciāls daļējā mutāciju izsekošanā, ja tajās tiek reprezentētas audos atrastās mutācijas (*Lee et al. 2018*). Cilvēku bioloģisko šķidrumu RNS sekvenēšana ir tehniski sarežģīta, jo iegūtie daudzumi ir zemā koncentrācijā un RNS bieži tiek degradēts pirms šķidrumu apstrādes vai apstrādes laikā. Lai gan ir veikti pētījumi par EV iekļautās RNS sekvenēšanu, nav pieejama informācija par atrastām mutācijām specifiski mazo RNS bibliotēkās (*Amorim et al. 2017; Savelyeva et al. 2017*). Iepriekš minētā informācija pierāda pētījuma nozīmīgumu, lai izvērtētu EV nozīmi somatisko mutāciju monitoringā.

#### 4.8.3. Klīniskā interpretācija

Ir nepieciešams izveidot sistēmu, pēc kuras varētu raksturot mutāciju bioloģisko un klīnisko nozīmi. Sekvenēšanas datu interpretācija nes atbildību par pacienta terapijas izvēli un ir ētiski nepieļaujama, ja tā nav precīza. Tā kā šādu lēmumu pieņemšana ir ļoti sarežģīta, datu analīzi varētu veikt tikai ekspertu-speciālistu komanda, kas sastāvētu no onkologiem, patoloģiem, molekulārajiem bioloģiem, ģenētiķiem un bioinformātiķiem. Speciālistu pieredzes trūkums rada nepieciešamību pēc kvalitatīvas, ģenētisko izmaiņu interpretācijas, tāpēc multidisciplināra ziņojuma uzģenerēšana iekļaujot pētījumu datus, klīniskos rādītājus un patoloģisko slēdzienu, kopumā, varētu sniegt precīzāku rekomendāciju terapijas izvēlē (*Gray et al. 2014; Naito et al. 2018*).

QIAGEN kompānija ir viena no kompānijām, kura ir izveidojusi šādu sistēmu- ‘QCI Precision Insights’ un ‘QCI Interpret’ (Anonymous 2020). To ir atļauts pielietot klīniskajā praksē un sistēma atļauj izvēlēties interpretācijas veidu, kas atbilst noteiktās valsts likumdošanai un vadlīnijām. Šo datubāzi katru nedēļu papildina 200 doktora grāda līmeņa speciālisti, papildot programmas interpretācijas spēju ar molekulāriem un terapeitiskiem datiem no vairāk kā 40 datubāzēm, tai skaitā no klīnisko pētījumu datubāzes un zāļu reģistra. Interpretācija sastāv no vairāk kā 20 gadu iegūto datu pielietošanas un molekulāro biologu, kā arī onkologu atsevišķu biomarkieru interpretācijas. Izraksts sniedz informāciju par mutāciju molekulārajiem marķieriem, to nozīmi slimību progresijā un izcelsmē, kā arī diagnostisko, terapeitisko un prognostisko nozīmīgumu. Taču komerciāli pieejamas sistēmas nav vienīgās, kas pašlaik ir izveidotas ģenētisko izmaiņu interpretācijai. Ir pieejamas arī par publiskiem līdzekļiem veidotas brīvpieejas datubāzes, kā piemēram *Precision Oncology Knowledge Database (OncoKB)*. Datubāze ir precīzijas onkoloģijas datubāze, kas ietver ģenētisko variāciju bioloģisko un klīnisko nozīmīgumu, sniedzot diagnostisko nozīmīgumu, ieteikumus terapijas izvēlē, kā arī prognostisko nozīmi. Datubāze pašlaik apraksta tieši somatiskās mutācijas, taču nākotnē plāno aprakstīt arī iedzimtās mutācijas.

Šī pētījuma turpinājumā ir plānots analizēt atlasītās mutācijas un izvērtēt to nozīmīgumu izmantojot kādu no pieejamām datubāzēm, vai pat piedāvāt informāciju, kas ir kombinēta no vairākām datubāzēm, lai veiktu rezultātu klīnisko interpretāciju.

## 5. SECINĀJUMI

- cfDNS ir nepieciešams izdalīt no nesasaldētiem plazmas paraugiem.
- Izmantojot mērķēto sekvencēšanu ir noteiktas mutācijas četriem krūts vēža pacientiem.
- Izdevās atlasīt audu somatiskās mutācijas, kuras paredzēts detektēt cfDNS.
- Parafīna bloku paraugos ir iespējamās svešas DNS kontaminācijas.
- Lai izvērtētu mutāciju dinamiskās izmaiņas, pētījumu ir nepieciešams turpināt.
- Lai izvērtētu mutāciju klīnisko nozīmīgumu, ir nepieciešams tās analizēt caur prognostiskām, ziņojumu ģenerējošām datubāzēm.

## 6. PATEICĪBAS

Vēlos izteikt pateicību maģistra darba vadītājai Aijai Linē par darba manuskripta labošanu kā arī par iespēju izstrādāt maģistra darbu Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā. Vēlos izteikt arī pateicību par palīdzību ar metožu apguvi un rezultātu interpretāciju Cristina Bajo Santos, palīdzību ar nukleīnskābju izdalīšanu Elizabetei Laiviņai, Kasparam Megnim par ieteikumiem cfDNS protokola optimizēšanā, Dr.biol. Pāvelam Zajakinam par sekvencēšanas datu apstrādi un Dr.biol. Artūram Ābolam par ieteikumiem metožu veikšanā. Vēlos pateikties Rīgas Austrumu Klīniskajai Slimnīcai par sadarbību projektā. Kā arī izsaku lielu pateicību Dr.biol. Dacei Pjanovai par recenzijas veikšanu. Darbs tika izstrādāts *“Personalizēts krūts vēža molekulārās diagnostikas tests zāļu izvēlei un slimības gaitas novērošanai (KC-PI-2017/23)”* ietvaros.

## 7. ATSAUCES

### 7.1 Publikācijas žurnālos

- Agostini, M., M. V. Enzo, C. Bedin, V. Belardinelli, E. Goldin, P. Del Bianco, E. Maschietto, E. D'Angelo, L. Izzi, A. Saccani, G. Zavagno and D. Nitti. 2012. Circulating cell-free DNA: a promising marker of regional lymphonode metastasis in breast cancer patients. - *Cancer Biomark*, 11 (2-3): 89-98.
- Aithal, A., S. Rauth, P. Kshirsagar, A. Shah, I. Lakshmanan, W. M. Junker, M. Jain, M. P. Ponnusamy and S. K. Batra. 2018. MUC16 as a novel target for cancer therapy. - *Expert Opin Ther Targets*, 22 (8): 675-686.
- Allouchery, V., L. Beaussire, A. Perdrix, D. Sefrioui, L. Augusto, C. Guillemet, N. Sarafan-Vasseur, F. Di Fiore and F. Clatot. 2018. Circulating ESR1 mutations at the end of aromatase inhibitor adjuvant treatment and after relapse in breast cancer patients. - *Breast Cancer Res*, 20 (1): 40.
- Amorim, M. G., R. Valieris, R. D. Drummond, M. P. Pizzi, V. M. Freitas, R. Sinigaglia-Coimbra, G. A. Calin, R. Pasqualini, W. Arap, I. T. Silva, E. Dias-Neto and D. N. Nunes. 2017. A total transcriptome profiling method for plasma-derived extracellular vesicles: applications for liquid biopsies. - *Sci Rep*, 7 (1): 14395.
- Anstey, E. H., M. L. Shoemaker, C. M. Barrera, M. E. O'Neil, A. B. Verma and D. M. Holman. 2017. Breastfeeding and Breast Cancer Risk Reduction: Implications for Black Mothers. - *Am J Prev Med*, 53 (3S1): S40-S46.
- Arimidex, T. A. o. i. C. T. G., J. F. Forbes, J. Cuzick, A. Buzdar, A. Howell, J. S. Tobias and M. Baum. 2008. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. - *Lancet Oncol*, 9 (1): 45-53.
- Badve, S. S. (2018). *AJCC Cancer Staging Manual, Eight Edition*, Chicago Publishing.
- Barrett-Connor, E., L. Mosca, P. Collins, M. J. Geiger, D. Grady, M. Kornitzer, M. A. McNabb, N. K. Wenger and I. Raloxifene Use for The Heart Trial. 2006. Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. - *N Engl J Med*, 355 (2): 125-137.
- Beaver, J. A., D. Jelovac, S. Balukrishna, R. Cochran, S. Croessmann, D. J. Zabransky, H. Y. Wong, P. V. Toro, J. Cidado, B. G. Blair, D. Chu, T. Burns, M. J. Higgins, V. Stearns, L. Jacobs, M. Habibi, J. Lange, P. J. Hurley, J. Lauring, D. VanDenBerg, J. Kessler, S. Jeter, M. L. Samuels, D. Maar, L. Cope, A. Cimino-Mathews, P. Argani, A. C. Wolff and B. H. Park. 2014. Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. - *Clin Cancer Res*, 20 (10): 2643-2650.
- Beije, N., A. M. Sieuwerts, J. Kraan, N. M. Van, W. Onstenk, S. R. Vitale, M. van der Vlugt-Daane, L. Y. Dirix, A. Brouwer, P. Hamberg, F. E. de Jongh, A. Jager, C. M. Seynaeve, M. Jansen, J. A. Foekens, J. W. M. Martens and S. Sleijfer. 2018. Estrogen receptor mutations and splice variants determined in liquid biopsies from metastatic breast cancer patients. - *Mol Oncol*, 12 (1): 48-57.
- Berx, G. and F. van Roy. 2009. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. - *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1 (6): a003129.
- Bidard, F. C., D. J. Peeters, T. Fehm, F. Nole, R. Gisbert-Criado, D. Mavroudis, S. Grisanti, D. Generali, J. A. Garcia-Saenz, J. Stebbing, C. Caldas, P. Gazzaniga, L. Manso, R. Zamarchi, A. F. de Lascoiti, L. De Mattos-Arruda, M. Ignatiadis, R. Lebofsky, S. J. van Laere, F. Meier-Stiegen, M. T. Sandri, J. Vidal-Martinez, E. Politaki, F. Consoli, A. Bottini, E. Diaz-Rubio, J. Krell, S. J. Dawson, C. Raimondi, A. Rutten, W. Janni, E. Munzone, V. Caranana, S. Agelaki, C. Almici, L. Dirix, E. F. Solomayer, L. Zorzino, H. Johannes, J. S. Reis-Filho, K. Pantel, J. Y. Pierga and S. Michiels. 2014. Clinical validity

of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. - *Lancet Oncol*, 15 (4): 406-414.

Board, R. E., A. M. Wardley, J. M. Dixon, A. C. Armstrong, S. Howell, L. Renshaw, E. Donald, A. Greystoke, M. Ranson, A. Hughes and C. Dive. 2010. Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer. - *Breast Cancer Res Treat*, 120 (2): 461-467.

Brewer, H. R., M. E. Jones, M. J. Schoemaker, A. Ashworth and A. J. Swerdlow. 2017. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. - *Breast Cancer Res Treat*, 165 (1): 193-200.

Bronkhorst, A. J., V. Ungerer and S. Holdenrieder. 2019. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. - *Biomol Detect Quantif*, 17 100087.

Buisson, R., A. M. Dion-Cote, Y. Coulombe, H. Launay, H. Cai, A. Z. Stasiak, A. Stasiak, B. Xia and J. Y. Masson. 2010. Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. - *Nat Struct Mol Biol*, 17 (10): 1247-1254.

Calaf Alsina, J. and P. J. Coronado Martin. 2013. [Third generation selective estrogen receptor modulators: benefits beyond bone. II, endometrial action]. - *Med Clin (Barc)*, 140 (6): 266-271.

Casadei, S., B. M. Norquist, T. Walsh, S. Stray, J. B. Mandell, M. K. Lee, J. A. Stamatoyannopoulos and M. C. King. 2011. Contribution of inherited mutations in the BRCA2-interacting protein PALB2 to familial breast cancer. - *Cancer Res*, 71 (6): 2222-2229.

Chandarlapaty, S., D. Chen, W. He, P. Sung, A. Samoila, D. You, T. Bhatt, P. Patel, M. Voi, M. Gnant, G. Hortobagyi, J. Baselga and M. E. Moynahan. 2016. Prevalence of ESR1 Mutations in Cell-Free DNA and Outcomes in Metastatic Breast Cancer: A Secondary Analysis of the BOLERO-2 Clinical Trial. - *JAMA Oncol*, 2 (10): 1310-1315.

Chehab, N. H., A. Malikzay, M. Appel and T. D. Halazonetis. 2000. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. - *Genes Dev*, 14 (3): 278-288.

Chen, H., J. Wu, Z. Zhang, Y. Tang, X. Li, S. Liu, S. Cao and X. Li. 2018. Association Between BRCA Status and Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis. - *Front Pharmacol*, 9 909.

Chen, L., L. Yang, L. Yao, X. Y. Kuang, W. J. Zuo, S. Li, F. Qiao, Y. R. Liu, Z. G. Cao, S. L. Zhou, X. Y. Zhou, W. T. Yang, J. X. Shi, W. Huang, X. Hu and Z. M. Shao. 2018. Characterization of PIK3CA and PIK3R1 somatic mutations in Chinese breast cancer patients. - *Nat Commun*, 9 (1): 1357.

Cho, H. S., K. Mason, K. X. Ramyar, A. M. Stanley, S. B. Gabelli, D. W. Denney, Jr. and D. J. Leahy. 2003. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. - *Nature*, 421 (6924): 756-760.

Colombo, M., G. Raposo and C. Thery. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. - *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30 255-289.

Cornen, S., A. Guille, J. Adelaide, L. Addou-Klouche, P. Finetti, M. R. Saade, M. Manai, N. Carbuccia, I. Bekhouche, A. Letessier, S. Raynaud, E. Charafe-Jauffret, J. Jacquemier, S. Spicuglia, H. de The, P. Viens, F. Bertucci, D. Birnbaum and M. Chaffanet. 2014. Candidate luminal B breast cancer genes identified by genome, gene expression and DNA methylation profiling. - *PLoS One*, 9 (1): e81843.

Cristofanilli, M., G. T. Budd, M. J. Ellis, A. Stopeck, J. Matera, M. C. Miller, J. M. Reuben, G. V. Doyle, W. J. Allard, L. W. Terstappen and D. F. Hayes. 2004. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. - *N Engl J Med*, 351 (8): 781-791.

Cutter, G. R. and Y. Liu. 2012. Personalized medicine: The return of the house call? - *Neurol Clin Pract*, 2 (4): 343-351.

- Cuzick, J., T. Powles, U. Veronesi, J. Forbes, R. Edwards, S. Ashley and P. Boyle. 2003. Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. - *Lancet*, 361 (9354): 296-300.
- Cuzick, J., I. Sestak, M. Baum, A. Buzdar, A. Howell, M. Dowsett, J. F. Forbes and A. L. investigators. 2010. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. - *Lancet Oncol*, 11 (12): 1135-1141.
- Cuzick, J., I. Sestak, B. Bonanni, J. P. Costantino, S. Cummings, A. DeCensi, M. Dowsett, J. F. Forbes, L. Ford, A. Z. LaCroix, J. Mershon, B. H. Mitlak, T. Powles, U. Veronesi, V. Vogel, D. L. Wickerham and S. C. o. B. C. O. Group. 2013. Selective oestrogen receptor modulators in prevention of breast cancer: an updated meta-analysis of individual participant data. - *Lancet*, 381 (9880): 1827-1834.
- Deng, Y., Q. Xie, G. Zhang, S. Li, Z. Wu, Z. Ma, X. He, Y. Gao, Y. Wang, X. Kang and J. Wang. 2019. Slow skeletal muscle troponin T, titin and myosin light chain 3 are candidate prognostic biomarkers for Ewing's sarcoma. - *Oncol Lett*, 18 (6): 6431-6442.
- Di Leo, A., S. Johnston, K. S. Lee, E. Ciruelos, P. E. Lonning, W. Janni, R. O'Regan, M. A. Mouret-Reynier, D. Kalev, D. Egle, T. Csoszi, R. Bordonaro, T. Decker, V. C. G. Tjan-Heijnen, S. Blau, A. Schirone, D. Weber, M. El-Hashimy, B. Dharan, D. Sellami and T. Bachelot. 2018. Buparlisib plus fulvestrant in postmenopausal women with hormone-receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer progressing on or after mTOR inhibition (BELLE-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. - *Lancet Oncol*, 19 (1): 87-100.
- Diehl, F., M. Li, D. Dressman, Y. He, D. Shen, S. Szabo, L. A. Diaz, Jr., S. N. Goodman, K. A. David, H. Juhl, K. W. Kinzler and B. Vogelstein. 2005. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. - *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (45): 16368-16373.
- Dubsky, P. C., R. Jakesz, B. Mlineritsch, S. Postlberger, H. Samonigg, W. Kwasny, C. Tausch, H. Stoger, K. Haider, F. Fitzal, C. F. Singer, M. Stierer, P. Sevelde, G. Luschin-Ebengreuth, S. Taucher, M. Rudas, R. Bartsch, G. G. Steger, R. Greil, L. Filipcic and M. Gnant. 2012. Tamoxifen and anastrozole as a sequencing strategy: a randomized controlled trial in postmenopausal patients with endocrine-responsive early breast cancer from the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. - *J Clin Oncol*, 30 (7): 722-728.
- Elomrani, F., M. Zine, M. Afif, S. L'Annaz, I. Ouziane, H. Mrabti and H. Errihani. 2015. Management of early breast cancer in older women: from screening to treatment. - *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 7 165-171.
- Emens, L. A. 2005. Trastuzumab: targeted therapy for the management of HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. - *Am J Ther*, 12 (3): 243-253.
- Eroles, P., A. Bosch, J. A. Perez-Fidalgo and A. Lluch. 2012. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. - *Cancer Treat Rev*, 38 (6): 698-707.
- Fang, F., S. Turcan, A. Rimner, A. Kaufman, D. Giri, L. G. Morris, R. Shen, V. Seshan, Q. Mo, A. Heguy, S. B. Baylin, N. Ahuja, A. Viale, J. Massague, L. Norton, L. T. Vahdat, M. E. Moynahan and T. A. Chan. 2011. Breast cancer methylomes establish an epigenomic foundation for metastasis. - *Sci Transl Med*, 3 (75): 75ra25.
- Fiala, C. and E. P. Diamandis. 2019. New approaches for detecting cancer with circulating cell-free DNA. - *BMC Med*, 17 (1): 159.
- Finn, R. S., M. Martin, H. S. Rugo, S. Jones, S. A. Im, K. Gelmon, N. Harbeck, O. N. Lipatov, J. M. Walshe, S. Moulder, E. Gauthier, D. R. Lu, S. Randolph, V. Dieras and D. J. Slamon. 2016. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. - *N Engl J Med*, 375 (20): 1925-1936.
- Fribbens, C., I. Garcia Murillas, M. Beaney, S. Hrebien, B. O'Leary, L. Kilburn, K. Howarth, M. Epstein, E. Green, N. Rosenfeld, A. Ring, S. Johnston and N. Turner. 2018.

Tracking evolution of aromatase inhibitor resistance with circulating tumour DNA analysis in metastatic breast cancer. - *Ann Oncol*, 29 (1): 145-153.

Fribbens, C., B. O'Leary, L. Kilburn, S. Hrebien, I. Garcia-Murillas, M. Beaney, M. Cristofanilli, F. Andre, S. Loi, S. Loibl, J. Jiang, C. H. Bartlett, M. Koehler, M. Dowsett, J. M. Bliss, S. R. Johnston and N. C. Turner. 2016. Plasma ESR1 Mutations and the Treatment of Estrogen Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. - *J Clin Oncol*, 34 (25): 2961-2968.

Garcia-Murillas, I., N. Chopra, I. Comino-Mendez, M. Beaney, H. Tovey, R. J. Cutts, C. Swift, D. Kriplani, M. Afentakis, S. Hrebien, G. Walsh-Crestani, P. Barry, S. R. D. Johnston, A. Ring, J. Bliss, S. Russell, A. Evans, A. Skene, D. Wheatley, M. Dowsett, I. E. Smith and N. C. Turner. 2019. Assessment of Molecular Relapse Detection in Early-Stage Breast Cancer. - *JAMA Oncol*,

Gibson, J. 2015. Anti-PD-L1 for metastatic triple-negative breast cancer. - *Lancet Oncol*, 16 (6): e264.

Gray, S. W., K. Hicks-Courant, A. Cronin, B. J. Rollins and J. C. Weeks. 2014. Physicians' attitudes about multiplex tumor genomic testing. - *J Clin Oncol*, 32 (13): 1317-1323.

Hankinson, S. E. 2005. Endogenous hormones and risk of breast cancer in postmenopausal women. - *Breast Dis*, 24 3-15.

Harbeck, N. and M. Gnant. 2017. Breast cancer. - *Lancet*, 389 (10074): 1134-1150.

Harbeck, N., F. Penault-Llorca, J. Cortes, M. Gnant, N. Houssami, P. Poortmans, K. Ruddy, J. Tsang and F. Cardoso. 2019. Breast cancer. - *Nat Rev Dis Primers*, 5 (1): 66.

Hearle, N., V. Schumacher, F. H. Menko, S. Olschwang, L. A. Boardman, J. J. Gille, J. J. Keller, A. M. Westerman, R. J. Scott, W. Lim, J. D. Trimbath, F. M. Giardiello, S. B. Gruber, G. J. Offerhaus, F. W. de Rooij, J. H. Wilson, A. Hansmann, G. Moslein, B. Royer-Pokora, T. Vogel, R. K. Phillips, A. D. Spigelman and R. S. Houlston. 2006. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. - *Clin Cancer Res*, 12 (10): 3209-3215.

Heikkinen, S., M. Koskenvuo, N. Malila, T. Sarkeala, E. Pukkala and J. Pitkaniemi. 2016. Use of exogenous hormones and the risk of breast cancer: results from self-reported survey data with validity assessment. - *Cancer Causes Control*, 27 (2): 249-258.

Heitzer, E., P. Ulz and J. B. Geigl. 2015. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. - *Clin Chem*, 61 (1): 112-123.

Hiscox, S., E. L. Davies and P. Barrett-Lee. 2009. Aromatase inhibitors in breast cancer. - *Maturitas*, 63 (4): 275-279.

Holm, K., C. Hegardt, J. Staaf, J. Vallon-Christersson, G. Jonsson, H. Olsson, A. Borg and M. Ringner. 2010. Molecular subtypes of breast cancer are associated with characteristic DNA methylation patterns. - *Breast Cancer Res*, 12 (3): R36.

Hortobagyi, G. N., D. Chen, M. Piccart, H. S. Rugo, H. A. Burris, 3rd, K. I. Pritchard, M. Campone, S. Noguchi, A. T. Perez, I. Deleu, M. Shtivelband, N. Masuda, S. Dakhil, I. Anderson, D. M. Robinson, W. He, A. Garg, E. R. McDonald, 3rd, H. Bitter, A. Huang, T. Taran, T. Bachelot, F. Lebrun, D. Leibl and J. Baselga. 2016. Correlative Analysis of Genetic Alterations and Everolimus Benefit in Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer: Results From BOLERO-2. - *J Clin Oncol*, 34 (5): 419-426.

Hortobagyi, G. N., S. M. Stemmer, H. A. Burris, Y. S. Yap, G. S. Sonke, S. Paluch-Shimon, M. Campone, K. L. Blackwell, F. Andre, E. P. Winer, W. Janni, S. Verma, P. Conte, C. L. Arteaga, D. A. Cameron, K. Petrakova, L. L. Hart, C. Villanueva, A. Chan, E. Jakobsen, A. Nusch, O. Burdaeva, E. M. Grischke, E. Alba, E. Wist, N. Marschner, A. M. Favret, D. Yardley, T. Bachelot, L. M. Tseng, S. Blau, F. Xuan, F. Souami, M. Miller, C. Germa, S. Hirawat and J. O'Shaughnessy. 2016. Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer. - *N Engl J Med*, 375 (18): 1738-1748.

- Hu, X., W. Huang and M. Fan. 2017. Emerging therapies for breast cancer. - *J Hematol Oncol*, 10 (1): 98.
- Hyman, D. M., L. M. Smyth, M. T. A. Donoghue, S. N. Westin, P. L. Bedard, E. J. Dean, H. Bando, A. B. El-Khoueiry, J. A. Perez-Fidalgo, A. Mita, J. H. M. Schellens, M. T. Chang, J. B. Reichel, N. Bouvier, S. D. Selcuklu, T. E. Soumerai, J. Torrisi, J. P. Erinjeri, H. Ambrose, J. C. Barrett, B. Dougherty, A. Foxley, J. P. O. Lindemann, R. McEwen, M. Pass, G. Schiavon, M. F. Berger, S. Chandarlapaty, D. B. Solit, U. Banerji, J. Baselga and B. S. Taylor. 2017. AKT Inhibition in Solid Tumors With AKT1 Mutations. - *J Clin Oncol*, 35 (20): 2251-2259.
- Iwama, E., K. Sakai, K. Azuma, T. Harada, D. Harada, K. Nosaki, K. Hotta, F. Ohyanagi, T. Kurata, T. Fukuhara, H. Akamatsu, K. Goto, T. Shimose, J. Kishimoto, Y. Nakanishi, K. Nishio and I. Okamoto. 2017. Monitoring of somatic mutations in circulating cell-free DNA by digital PCR and next-generation sequencing during afatinib treatment in patients with lung adenocarcinoma positive for EGFR activating mutations. - *Ann Oncol*, 28 (1): 136-141.
- Jeselsohn, R., R. Yelensky, G. Buchwalter, G. Frampton, F. Meric-Bernstam, A. M. Gonzalez-Angulo, J. Ferrer-Lozano, J. A. Perez-Fidalgo, M. Cristofanilli, H. Gomez, C. L. Arteaga, J. Giltane, J. M. Balko, M. T. Cronin, M. Jarosz, J. Sun, M. Hawryluk, D. Lipson, G. Otto, J. S. Ross, A. Dvir, L. Soussan-Gutman, I. Wolf, T. Rubinek, L. Gilmore, S. Schnitt, S. E. Come, L. Pusztai, P. Stephens, M. Brown and V. A. Miller. 2014. Emergence of constitutively active estrogen receptor-alpha mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer. - *Clin Cancer Res*, 20 (7): 1757-1767.
- Junttila, T. T., R. W. Akita, K. Parsons, C. Fields, G. D. Lewis Phillips, L. S. Friedman, D. Sampath and M. X. Sliwkowski. 2009. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. - *Cancer Cell*, 15 (5): 429-440.
- Kalluri, R. and V. S. LeBleu. 2016. Discovery of Double-Stranded Genomic DNA in Circulating Exosomes. - *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 81 275-280.
- Kim, K. I., K. H. Lee, T. R. Kim, Y. S. Chun, T. H. Lee and H. K. Park. 2014. Ki-67 as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. - *J Breast Cancer*, 17 (1): 40-46.
- Kim, S. B., R. Dent, S. A. Im, M. Espie, S. Blau, A. R. Tan, S. J. Isakoff, M. Oliveira, C. Saura, M. J. Wongchenko, A. V. Kapp, W. Y. Chan, S. M. Singel, D. J. Maslyar, J. Baselga and L. investigators. 2017. Ipatasertib plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (LOTUS): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. - *Lancet Oncol*, 18 (10): 1360-1372.
- Kimura, F., A. Ueda, E. Sato, J. Akimoto, H. Kaise, K. Yamada, M. Hosonaga, Y. Kawai, S. Teraoka, M. Okazaki and T. Ishikawa. 2017. Hereditary breast cancer associated with Cowden syndrome-related PTEN mutation with Lhermitte-Duclos disease. - *Surg Case Rep*, 3 (1): 83.
- Kwapisz, D. 2018. Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in hormone receptor-positive early breast cancer: preliminary results and ongoing studies. - *Breast Cancer*, 25 (5): 506-516.
- Lawrence, M. S., P. Stojanov, P. Polak, G. V. Kryukov, K. Cibulskis, A. Sivachenko, S. L. Carter, C. Stewart, C. H. Mermel, S. A. Roberts, A. Kiezun, P. S. Hammerman, A. McKenna, Y. Drier, L. Zou, A. H. Ramos, T. J. Pugh, N. Stransky, E. Helman, J. Kim, C. Sougnez, L. Ambrogio, E. Nickerson, E. Shefler, M. L. Cortes, D. Auclair, G. Saksena, D. Voet, M. Noble, D. DiCara, P. Lin, L. Lichtenstein, D. I. Heiman, T. Fennell, M. Imielinski, B. Hernandez, E. Hodis, S. Baca, A. M. Dulak, J. Lohr, D. A. Landau, C. J. Wu, J. Melendez-Zajgla, A. Hidalgo-Miranda, A. Koren, S. A. McCarroll, J. Mora, B. Crompton, R. Onofrio, M. Parkin, W. Winckler, K. Ardlie, S. B. Gabriel, C. W. M. Roberts, J. A.

Biegel, K. Stegmaier, A. J. Bass, L. A. Garraway, M. Meyerson, T. R. Golub, D. A. Gordenin, S. Sunyaev, E. S. Lander and G. Getz. 2013. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. - *Nature*, 499 (7457): 214-218.

Lazaro-Ibanez, E., A. Sanz-Garcia, T. Visakorpi, C. Escobedo-Lucea, P. Siljander, A. Ayuso-Sacido and M. Yliperttula. 2014. Different gDNA content in the subpopulations of prostate cancer extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes. - *Prostate*, 74 (14): 1379-1390.

Lee, D. H., H. Yoon, S. Park, J. S. Kim, Y. H. Ahn, K. Kwon, D. Lee and K. H. Kim. 2018. Urinary Exosomal and cell-free DNA Detects Somatic Mutation and Copy Number Alteration in Urothelial Carcinoma of Bladder. - *Sci Rep*, 8 (1): 14707.

Lee, J. H., H. Jeong, J. W. Choi, H. E. Oh and Y. S. Kim. 2018. Liquid biopsy prediction of axillary lymph node metastasis, cancer recurrence, and patient survival in breast cancer: A meta-analysis. - *Medicine (Baltimore)*, 97 (42): e12862.

Lee, J. S., K. M. Collins, A. L. Brown, C. H. Lee and J. H. Chung. 2000. hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. - *Nature*, 404 (6774): 201-204.

Leon, S. A., B. Shapiro, D. M. Sklaroff and M. J. Yaros. 1977. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. - *Cancer Res*, 37 (3): 646-650.

Li, S., D. Shen, J. Shao, R. Crowder, W. Liu, A. Prat, X. He, S. Liu, J. Hoog, C. Lu, L. Ding, O. L. Griffith, C. Miller, D. Larson, R. S. Fulton, M. Harrison, T. Mooney, J. F. McMichael, J. Luo, Y. Tao, R. Goncalves, C. Schlosberg, J. F. Hiken, L. Saied, C. Sanchez, T. Giuntoli, C. Bumb, C. Cooper, R. T. Kitchens, A. Lin, C. Phommaly, S. R. Davies, J. Zhang, M. S. Kavuri, D. McEachern, Y. Y. Dong, C. Ma, T. Pluard, M. Naughton, R. Bose, R. Suresh, R. McDowell, L. Michel, R. Aft, W. Gillanders, K. DeSchryver, R. K. Wilson, S. Wang, G. B. Mills, A. Gonzalez-Angulo, J. R. Edwards, C. Maher, C. M. Perou, E. R. Mardis and M. J. Ellis. 2013. Endocrine-therapy-resistant ESR1 variants revealed by genomic characterization of breast-cancer-derived xenografts. - *Cell Rep*, 4 (6): 1116-1130.

Ligthart, S. T., F. A. Coumans, F. C. Bidard, L. H. Simkens, C. J. Punt, M. R. de Groot, G. Attard, J. S. de Bono, J. Y. Pierga and L. W. Terstappen. 2013. Circulating Tumor Cells Count and Morphological Features in Breast, Colorectal and Prostate Cancer. - *PLoS One*, 8 (6): e67148.

Lin, Z., J. Neiswender, B. Fang, X. Ma, J. Zhang and X. Hu. 2017. Value of circulating cell-free DNA analysis as a diagnostic tool for breast cancer: a meta-analysis. - *Oncotarget*, 8 (16): 26625-26636.

Litton, J. K., H. S. Rugo, J. Ettl, S. A. Hurvitz, A. Goncalves, K. H. Lee, L. Fehrenbacher, R. Yerushalmi, L. A. Mina, M. Martin, H. Roche, Y. H. Im, R. G. W. Quek, D. Markova, I. C. Tudor, A. L. Hannah, W. Eiermann and J. L. Blum. 2018. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. - *N Engl J Med*, 379 (8): 753-763.

Lobbes, M. B., M. L. Smidt, J. Houwers, V. C. Tjan-Heijnen and J. E. Wildberger. 2013. Contrast enhanced mammography: techniques, current results, and potential indications. - *Clin Radiol*, 68 (9): 935-944.

Loibl, S., C. Jackisch, A. Schneeweiss, S. Schmatloch, B. Aktas, C. Denkert, H. Wiebringhaus, S. Kummel, M. Warm, S. Paepke, M. Just, C. Hanusch, J. Hackmann, J. U. Blohmer, M. Clemens, S. Dan Costa, B. Gerber, K. Engels, V. Nekljudova, G. von Minckwitz, M. Untch, G. investigators of the German Breast and g. the Arbeitsgemeinschaft Gynakologische Onkologie-Breast study. 2017. Dual HER2-blockade with pertuzumab and trastuzumab in HER2-positive early breast cancer: a subanalysis of data from the randomized phase III GeparSepto trial. - *Ann Oncol*, 28 (3): 497-504.

Lynch, T. J., D. W. Bell, R. Sordella, S. Gurubhagavatula, R. A. Okimoto, B. W. Brannigan, P. L. Harris, S. M. Haserlat, J. G. Supko, F. G. Haluska, D. N. Louis, D. C. Christiani, J. Settleman and D. A. Haber. 2004. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. - *N Engl J Med*, 350 (21): 2129-2139.

Maisonneuve, P., D. Disalvatore, N. Rotmensz, G. Curigliano, M. Colleoni, S. Dellapasqua, G. Pruneri, M. G. Mastropasqua, A. Luini, F. Bassi, G. Pagani, G. Viale and A. Goldhirsch. 2014. Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer subtypes. - *Breast Cancer Res*, 16 (3): R65.

Manie, E., A. Vincent-Salomon, J. Lehmann-Che, G. Pierron, E. Turpin, M. Warcoï, N. Gruel, I. Lebigot, X. Sastre-Garau, R. Lidereau, A. Remenieras, J. Feunteun, O. Delattre, H. de The, D. Stoppa-Lyonnet and M. H. Stern. 2009. High frequency of TP53 mutation in BRCA1 and sporadic basal-like carcinomas but not in BRCA1 luminal breast tumors. - *Cancer Res*, 69 (2): 663-671.

Menes, T. S., K. Kerlikowske, J. Lange, S. Jaffer, R. Rosenberg and D. L. Miglioretti. 2017. Subsequent Breast Cancer Risk Following Diagnosis of Atypical Ductal Hyperplasia on Needle Biopsy. - *JAMA Oncol*, 3 (1): 36-41.

Milioli, H. H., R. Vimieiro, I. Tishchenko, C. Riveros, R. Berretta and P. Moscato. 2016. Iteratively refining breast cancer intrinsic subtypes in the METABRIC dataset. - *BioData Min*, 9 2.

Minciacci, V. R., M. R. Freeman and D. Di Vizio. 2015. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. - *Semin Cell Dev Biol*, 40 41-51.

Naito, Y., H. Takahashi, K. Shitara, W. Okamoto, H. Bando, T. Kuwata, Y. Kuboki, S. Matsumoto, I. Miki, T. Yamanaka, A. Watanabe and M. Kojima. 2018. Feasibility study of cancer genome alterations identified by next generation sequencing: ABC study. - *Jpn J Clin Oncol*, 48 (6): 559-564.

Naito, Y. and T. Urasaki. 2018. Precision medicine in breast cancer. - *Chin Clin Oncol*, 7 (3): 29.

Nandikolla, A. G., S. Venugopal and J. Anampa. 2017. Breast cancer in patients with Li-Fraumeni syndrome - a case-series study and review of literature. - *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 9 207-215.

Nielsen, D. L., M. Andersson and C. Kamby. 2009. HER2-targeted therapy in breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. - *Cancer Treat Rev*, 35 (2): 121-136.

Ogrodnik, A., T. W. Hudon, P. M. Nadkarni and R. Y. Chandawarkar. 2013. Radiation exposure and breast cancer: lessons from Chernobyl. - *Conn Med*, 77 (4): 227-234.

Olayioye, M. A. 2001. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. - *Breast Cancer Res*, 3 (6): 385-389.

Pabalan, N., H. Jarjanazi and H. Ozcelik. 2013. Association between BRIP1 (BACH1) polymorphisms and breast cancer risk: a meta-analysis. - *Breast Cancer Res Treat*, 137 (2): 553-558.

Patnaik, A., P. Haluska, A. W. Tolcher, C. Erlichman, K. P. Papadopoulos, J. L. Lensing, M. Beeram, J. R. Molina, D. W. Rasco, R. R. Arcos, C. S. Kelly, S. R. Wijayawardana, X. Zhang, L. F. Stancato, R. Bell, P. Shi, P. Kulanthaivel, C. Pitou, L. B. Mulle, D. L. Farrington, E. M. Chan and M. P. Goetz. 2016. A First-in-Human Phase I Study of the Oral p38 MAPK Inhibitor, Ralimetinib (LY2228820 Dimesylate), in Patients with Advanced Cancer. - *Clin Cancer Res*, 22 (5): 1095-1102.

Pharoah, P. D., P. Guilford, C. Caldas and C. International Gastric Cancer Linkage. 2001. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. - *Gastroenterology*, 121 (6): 1348-1353.

Prat, A., J. S. Parker, C. Fan and C. M. Perou. 2012. PAM50 assay and the three-gene model for identifying the major and clinically relevant molecular subtypes of breast cancer. - *Breast Cancer Res Treat*, 135 (1): 301-306.

Prat, A., E. Pineda, B. Adamo, P. Galvan, A. Fernandez, L. Gaba, M. Diez, M. Viladot, A. Arance and M. Munoz. 2015. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. - *Breast*, 24 Suppl 2 S26-35.

Qiao, Y., C. Badduke, E. Mercier, S. M. Lewis, P. Pavlidis and E. Rajcan-Separovic. 2013. miRNA and miRNA target genes in copy number variations occurring in individuals with intellectual disability. - *BMC Genomics*, 14 544.

Rahman, N., S. Seal, D. Thompson, P. Kelly, A. Renwick, A. Elliott, S. Reid, K. Spanova, R. Barfoot, T. Chagtai, H. Jayatilake, L. McGuffog, S. Hanks, D. G. Evans, D. Eccles, C. Breast Cancer Susceptibility, D. F. Easton and M. R. Stratton. 2007. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. - *Nat Genet*, 39 (2): 165-167.

Rath, M. G., S. Masciari, R. Gelman, A. Miron, P. Miron, K. Foley, A. L. Richardson, I. E. Krop, S. J. Verselis, D. A. Dillon and J. E. Garber. 2013. Prevalence of germline TP53 mutations in HER2+ breast cancer patients. - *Breast Cancer Res Treat*, 139 (1): 193-198.

Robson, M., S. A. Im, E. Senkus, B. Xu, S. M. Domchek, N. Masuda, S. Delalogue, W. Li, N. Tung, A. Armstrong, W. Wu, C. Goessl, S. Runswick and P. Conte. 2017. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. - *N Engl J Med*, 377 (6): 523-533.

Sabatier, R., P. Finetti, E. Mamessier, J. Adelaide, M. Chaffanet, H. R. Ali, P. Viens, C. Caldas, D. Birnbaum and F. Bertucci. 2015. Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. - *Oncotarget*, 6 (7): 5449-5464.

Savelyeva, A. V., E. V. Kuligina, D. N. Bariakin, V. V. Kozlov, E. I. Ryabchikova, V. A. Richter and D. V. Semenov. 2017. Variety of RNAs in Peripheral Blood Cells, Plasma, and Plasma Fractions. - *Biomed Res Int*, 2017 7404912.

Schiavon, G., S. Hrebien, I. Garcia-Murillas, R. J. Cutts, A. Pearson, N. Tarazona, K. Fenwick, I. Kozarewa, E. Lopez-Knowles, R. Ribas, A. Nerurkar, P. Osin, S. Chandarlapaty, L. A. Martin, M. Dowsett, I. E. Smith and N. C. Turner. 2015. Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. - *Sci Transl Med*, 7 (313): 313ra182.

Schwarzenbach, H., V. Muller, K. Milde-Langosch, B. Steinbach and K. Pantel. 2011. Evaluation of cell-free tumour DNA and RNA in patients with breast cancer and benign breast disease. - *Mol Biosyst*, 7 (10): 2848-2854.

Shaw, J. A., K. Page, K. Blighe, N. Hava, D. Guttery, B. Ward, J. Brown, C. Ruangpratheep, J. Stebbing, R. Payne, C. Palmieri, S. Cleator, R. A. Walker and R. C. Coombes. 2012. Genomic analysis of circulating cell-free DNA infers breast cancer dormancy. - *Genome Res*, 22 (2): 220-231.

Shawarby, M. A., D. M. Al-Tamimi and A. Ahmed. 2011. Very low prevalence of epidermal growth factor receptor (EGFR) protein expression and gene amplification in Saudi breast cancer patients. - *Diagn Pathol*, 6 57.

Shimoi, T., A. Hamada, M. Yamagishi, M. Hirai, M. Yoshida, T. Nishikawa, K. Sudo, A. Shimomura, E. Noguchi, M. Yunokawa, K. Yonemori, C. Shimizu, T. Kinoshita, T. Fukuda, Y. Fujiwara and K. Tamura. 2018. PIK3CA mutation profiling in patients with breast cancer, using a highly sensitive detection system. - *Cancer Sci*, 109 (8): 2558-2566.

Smart, C. R. 1997. Limitations of the randomized trial for the early detection of cancer: a clinical perspective. - *Cancer*, 79 (9): 1740-1746.

Smith, T. R., W. Liu-Mares, B. O. Van Emburgh, E. A. Levine, G. O. Allen, J. W. Hill, I. M. Reis, L. A. Kresty, M. D. Pegram, M. S. Miller and J. J. Hu. 2011. Genetic polymorphisms of multiple DNA repair pathways impact age at diagnosis and TP53 mutations in breast cancer. - *Carcinogenesis*, 32 (9): 1354-1360.

Song, H., S. J. Ramus, S. K. Kjaer, E. Hogdall, R. A. Dicioccio, A. S. Whittemore, V. McGuire, C. Hogdall, I. J. Jacobs, D. F. Easton, B. A. Ponder, A. M. Dunning, S. A. Gayther and P. D. Pharoah. 2007. Tagging single nucleotide polymorphisms in the BRIP1 gene and susceptibility to breast and ovarian cancer. - *PLoS One*, 2 (3): e268.

Souza, M. F., H. Kuasne, M. C. Barros-Filho, H. L. Ciliao, F. A. Marchi, P. E. Fuganti, A. R. Paschoal, S. R. Rogatto and I. M. S. Colus. 2017. Circulating mRNAs and miRNAs as candidate markers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. - *PLoS One*, 12 (9): e0184094.

Spoerke, J. M., S. Gendreau, K. Walter, J. Qiu, T. R. Wilson, H. Savage, J. Aimi, M. K. Derynck, M. Chen, I. T. Chan, L. C. Amler, G. M. Hampton, S. Johnston, I. Krop, P. Schmid and M. R. Lackner. 2016. Heterogeneity and clinical significance of ESR1 mutations in ER-positive metastatic breast cancer patients receiving fulvestrant. - *Nat Commun*, 7 11579.

Sporn, M. B. 1976. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. - *Cancer Res*, 36 (7 PT 2): 2699-2702.

Stanton, S. E. and M. L. Disis. 2016. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. - *J Immunother Cancer*, 4 59.

Stefansson, O. A., S. Moran, A. Gomez, S. Sayols, C. Arribas-Jorba, J. Sandoval, H. Hilmarsdottir, E. Olafsdottir, L. Tryggvadottir, J. G. Jonasson, J. Eyfjord and M. Esteller. 2015. A DNA methylation-based definition of biologically distinct breast cancer subtypes. - *Mol Oncol*, 9 (3): 555-568.

Sun, Y. S., Z. Zhao, Z. N. Yang, F. Xu, H. J. Lu, Z. Y. Zhu, W. Shi, J. Jiang, P. P. Yao and H. P. Zhu. 2017. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. - *Int J Biol Sci*, 13 (11): 1387-1397.

Surakasula, A., G. C. Nagarjunapu and K. V. Raghavaiah. 2014. A comparative study of pre- and post-menopausal breast cancer: Risk factors, presentation, characteristics and management. - *J Res Pharm Pract*, 3 (1): 12-18.

Takaku, M., S. A. Grimm, J. D. Roberts, K. Chrysovergis, B. D. Bennett, P. Myers, L. Perera, C. J. Tucker, C. M. Perou and P. A. Wade. 2018. GATA3 zinc finger 2 mutations reprogram the breast cancer transcriptional network. - *Nat Commun*, 9 (1): 1059.

Thakur, B. K., H. Zhang, A. Becker, I. Matei, Y. Huang, B. Costa-Silva, Y. Zheng, A. Hoshino, H. Brazier, J. Xiang, C. Williams, R. Rodriguez-Barrueco, J. M. Silva, W. Zhang, S. Hearn, O. Elemento, N. Paknejad, K. Manova-Todorova, K. Welte, J. Bromberg, H. Peinado and D. Lyden. 2014. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. - *Cell Res*, 24 (6): 766-769.

Toklu, H. and N. H. Nogay. 2018. Effects of dietary habits and sedentary lifestyle on breast cancer among women attending the oncology day treatment center at a state university in Turkey. - *Niger J Clin Pract*, 21 (12): 1576-1584.

Turner, N. C., J. Ro, F. Andre, S. Loi, S. Verma, H. Iwata, N. Harbeck, S. Loibl, C. Huang Bartlett, K. Zhang, C. Giorgetti, S. Randolph, M. Koehler, M. Cristofanilli and P. S. Group. 2015. Palbociclib in Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. - *N Engl J Med*, 373 (3): 209-219.

Vallard, A., N. Magne, J. B. Guy, S. Espenel, C. Rancoule, P. Diao, E. Deutsch, S. Rivera and C. Chargari. 2019. Is breast-conserving therapy adequate in BRCA 1/2 mutation carriers? The radiation oncologist's point of view. - *Br J Radiol*, 92 (1097): 20170657.

Voduc, K. D., M. C. Cheang, S. Tyldesley, K. Gelmon, T. O. Nielsen and H. Kennecke. 2010. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. - *J Clin Oncol*, 28 (10): 1684-1691.

Vogenberg, F. R., C. Isaacson Barash and M. Pursel. 2010. Personalized medicine: part 1: evolution and development into theranostics. - P T, 35 (10): 560-576.

von Minckwitz, G., M. Procter, E. de Azambuja, D. Zardavas, M. Benyunes, G. Viale, T. Suter, A. Arahmani, N. Rouchet, E. Clark, A. Knott, I. Lang, C. Levy, D. A. Yardley, J. Bines, R. D. Gelber, M. Piccart, J. Baselga, A. S. Committee and Investigators. 2017. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. - N Engl J Med, 377 (2): 122-131.

Vu, T. and F. X. Claret. 2012. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. - Front Oncol, 2 62.

Wang, P., A. Bahreini, R. Gyanchandani, P. C. Lucas, R. J. Hartmaier, R. J. Watters, A. R. Jonnalagadda, H. E. Trejo Bittar, A. Berg, R. L. Hamilton, B. F. Kurland, K. R. Weiss, A. Mathew, J. P. Leone, N. E. Davidson, M. N. Nikiforova, A. M. Brufsky, T. F. Ambros, A. M. Stern, S. L. Puhalla, A. V. Lee and S. Oesterreich. 2016. Sensitive Detection of Mono- and Polyclonal ESR1 Mutations in Primary Tumors, Metastatic Lesions, and Cell-Free DNA of Breast Cancer Patients. - Clin Cancer Res, 22 (5): 1130-1137.

Xia, H., S. Ma, S. Wang and G. Sun. 2015. Meta-Analysis of Saturated Fatty Acid Intake and Breast Cancer Risk. - Medicine (Baltimore), 94 (52): e2391.

Yang, Y., W. Pan, X. Tang, S. Wu and X. Sun. 2017. A meta-analysis of randomized controlled trials comparing the efficacy and safety of anastrozole versus tamoxifen for breast cancer. - Oncotarget, 8 (29): 48362-48374.

Yardley, D. A., R. R. Ismail-Khan, B. Melichar, M. Lichinitser, P. N. Munster, P. M. Klein, S. Cruickshank, K. D. Miller, M. J. Lee and J. B. Trepel. 2013. Randomized phase II, double-blind, placebo-controlled study of exemestane with or without entinostat in postmenopausal women with locally recurrent or metastatic estrogen receptor-positive breast cancer progressing on treatment with a nonsteroidal aromatase inhibitor. - J Clin Oncol, 31 (17): 2128-2135.

## 7.2 Interneta resursi

Anonymous 2018. BRCA Mutations: Cancer Risk and Genetic Testing. from <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics/brca-fact-sheet>.

Anonymous 2019. Breast Anatomy & USA. from <https://sites.google.com/site/aggiedms136portfolio/artifact-2>.

Anonymous 2017. Jewish Women and BRCA Gene Mutations. from [https://www.cdc.gov/cancer/breast/young\\_women/bringyourbrave/hereditary\\_breast\\_cancer/jewish\\_women\\_brca.htm](https://www.cdc.gov/cancer/breast/young_women/bringyourbrave/hereditary_breast_cancer/jewish_women_brca.htm).

Anonymous 2020. MammaPrint: a test to predict risk of breast cancer recurrence. from <https://www.agendia.com/our-tests/mammaprint/>.

Anonymous 2019. NCCN Guidelines®. from [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/).

Anonymous 2019. Oncotype DX Test. from [https://www.breastcancer.org/symptoms/testing/types/oncotype\\_dx](https://www.breastcancer.org/symptoms/testing/types/oncotype_dx).

Anonymous 2011. Organizētais vēža skrīnings. from [http://www.vm.gov.lv/images/userfiles/phoebe/ministrija\\_sabiedribas\\_lidzdaliba\\_ab75e1a6c38b637dc22573d800293aaa/organizetais\\_veza\\_skrinings.pdf](http://www.vm.gov.lv/images/userfiles/phoebe/ministrija_sabiedribas_lidzdaliba_ab75e1a6c38b637dc22573d800293aaa/organizetais_veza_skrinings.pdf).

Anonymous 2019. PAM50 (Prosigna). from

Anonymous 2020. QCI Precision Insights. from <https://digitalinsights.qiagen.com/products-overview/clinical-insights-portfolio/qiagen-clinical-insight/na/qci-precision-insights/>.

Anonymous 2019. The thescreen PIK3CA RGQ PCR Kit - P190001 and P190004. from <https://www.fda.gov/medical-devices/recently-approved-devices/therascreen-pik3ca-rgq-pcr-kit-p190001-and-p190004>.

Anonymous 2020. UMI. from <https://www.illumina.com/science/sequencing-method-explorer/kits-and-arrays/umi.html>.

Anonymous 2018. What To Do If You've Tested Positive. from <https://www.nationalbreastcancer.org/what-to-do-if-youve-tested-positive>.

Anonymous 2020. World Health Organization - Cancer Today. Data vizualization tools for exploring the global cancer burden in 2018. from <https://gco.iarc.fr/today/home>



Ceturtnā krūts vēža pacienta somatiskās mutācijas

Appendix 2

Somatic mutations for the fourth breast cancer patient.

Hr	Pozīcija	Gēns	Mutācijas frekvence,%	Pārklājums pēc deduplikācijas	Mut.veids	AS	Kodons	Ietekme	COSM
19	8962434	<i>MUC16</i>	38,46	64	int_var	-	-	MODI	-
1	40365437	<i>MYCL</i>	34,72	72	int_var	-	-	MODI	-
1	154842225	<i>KCNN3</i>	24,00	200	inf_ins	QQQQ/QQ QQQQQQ	CAGCAGCAGCag/C AGCAGCAGCAACAG CAGCAGCag	MODE	-
19	8997192	<i>MUC16</i>	19,05	147	int_var	-	-	MODI	-
1	154842199	<i>KCNN3</i>	18,52	194	inf_ins	QQQQQQQ QQQQQQQ P/QQQQQQ QQQQQQQ QQP	CAGCAGCAGCAGCA GCAGCAGCAGCAGC AGCAGCAGCAGCAG Cca/CAGCAGCAGCA GCAGCAGCAGCAGC AGCAGCAGCAGCAG CAGCAGCca	MODE	-
14	105239146	<i>AKT1</i>	16,88	262	int_var	-	-	MODI	-
19	9007748	<i>MUC16</i>	15,29	145	int_var	-	-	MODI	-
7	55248926	<i>EGFR</i>	9,68	326	int_var	-	-	MODI	-
1	120612040	<i>NOTCH2</i>	9,25	173	5'UTR_var	-	-	MODI	-
22	29091877	<i>CHEK2</i>	6,78	111	int_var	-	-	MODI	-
16	68771418	<i>CDH1</i>	6,72	209	int_var	-	-	MODI	-
1	154842233	<i>KCNN3</i>	6,57	198	stop,inf_ins	Q/Q*	cAG/cAGTAG	HIGH	-
1	211832089	<i>NEK2</i>	6,00	100	down_g_var	-	-	MODI	-
16	68849513	<i>CDH1</i>	5,43	131	syn_var	T	aC/c/aCg	LOW	-
16	68849516	<i>CDH1</i>	5,43	131	syn_var	V	gtC/gtG	LOW	-
8	38273404	<i>FGFR1</i>	5,41	132	mis_var	Y/F	tAt/tTt	MODE	-
16	68771410	<i>CDH1</i>	5,26	209	int_var	-	-	MODI	-
16	68771414	<i>CDH1</i>	5,26	201	int_var	-	-	MODI	-
7	151932985	<i>KMT2C</i>	5,10	306	mis_var	P/S	Cct/Tct	MODE	-
19	9048822	<i>MUC16</i>	5,00	134	syn_var	L	Ctg/Ttg	LOW	COSM363816,COSM363817, COSM3933268,COSM3933269
X	70341606	<i>MED12</i>	4,71	158	mis_var	S/R	agT/agA	MODE	COSM4110807,COSM4110808
19	9009614	<i>MUC16</i>	4,35	222	mis_var	T/A	Acc/Gcc	MODE	-
5	112176008	<i>APC</i>	4,27	182	mis_var	E/K	Gaa/Aaa	MODE	COSM4167225,COSM6196800, COSM7166843
16	68849508	<i>CDH1</i>	4,26	135	mis_var	A/S	Gcc/Tcc	MODE	-
7	6043589	<i>PMS2</i>	4,24	224	int_var	-	-	MODI	-
8	38274842	<i>FGFR1</i>	4,21	154	mis_var	G/R	Ggg/Cgg	MODE	-
8	2806920	<i>CSMD1</i>	4,10	264	int_var	-	-	MODI	-
2	17954401	<i>GEN1</i>	4,08	159	splice_d_v	-	-	HIGH	-
6	152565736	<i>SYNE1</i>	3,70	179	stop	L/*	tTa/tAa	HIGH	-
11	108183154	<i>ATM</i>	3,67	180	mis_var	E/K	Gaa/Aaa	MODE	COSM6067438,COSM6067439
13	32968941	<i>BRCA2</i>	3,48	170	syn_var	N	aaC/aaT	LOW	-
7	6043721	<i>PMS2</i>	3,33	209	int_var	-	-	MODI	-
1	211832061	<i>NEK2</i>	3,27	159	down_g_var	-	-	MODI	-
16	68771431	<i>CDH1</i>	3,25	211	int_var	-	-	MODI	-
15	64048793	<i>HERC1</i>	3,23	181	mis_var	K/R	aAg/aGg	MODE	-
6	152631036	<i>SYNE1</i>	3,15	175	syn_var	A	gct/gcC	LOW	-
6	564632	<i>EXOC2</i>	3,14	234	mis_var	R/P	cGg/cCg	MODE	-
19	9009681	<i>MUC16</i>	3,11	252	syn_var	L	ctC/ctA	LOW	COSM715535,COSM715536
17	29508819	<i>NF1</i>	3,05	165	int_var	-	-	MODI	-

Maģistra darbs „Personalizēta krūts vēža molekulārā diagnostikas testa izstrāde individuāli pielāgotai ārstniecības izvēlei un slimības gaitas novērošanai” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Artūrs Bušs

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Asoc. prof. Aija Linē

Recenzents:

Dr. biol. Dace Pjanova

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē

Lietvede: Diāna Marcinkēviča

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē

10.06.2020 prot. Nr. \_\_\_\_\_, vērtējums \_\_\_\_\_

Komisijas sekretārs: \_\_\_\_\_