



(51) МПК

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/6806 (2018.01)

C12Q 1/6827 (2018.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

C12Q 1/6876 (2018.01)

C12Q 1/6886 (2018.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/58 (2023.05); G01N 33/57415 (2023.02); C12Q 1/6806 (2023.02); C12Q 1/6827 (2023.02); C12Q 1/686 (2023.02); C12Q 1/6876 (2023.02); C12Q 1/6886 (2023.02)

(21)(22) Заявка: 2022128623, 03.11.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
03.11.2022

Дата регистрации:

23.06.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 03.11.2022

(45) Опубликовано: 23.06.2023 Бюл. № 18

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.
Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, Шевцовой
И.В.

(72) Автор(ы):

Чурносов Михаил Иванович (RU),
Павлова Надежда Витальевна (RU),
Елыкова Анна Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: ПАВЛОВА Н.В. и др. Роль
высокопенетрантных мутаций в генах BRCA1
и CHEK2 в характере ассоциаций
полиморфизма генов матриксных
металлопротеиназ с раком молочной железы.
Научные результаты биомедицинских
исследований. 2022; 8(2): 180-197 (Ссылка
помещена на сайт в Интернет 17 июня 2022
года URL: (см. прод.)(54) Способ прогнозирования низкого риска развития рака молочной железы у женщин с
высокопенетрантными мутациями в генах BRCA1 и CHEK2

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к клинической онкологии, медицинской генетике, молекулярной диагностике, и может быть использовано для прогнозирования низкого риска развития рака молочной железы у женщин русской национальности с высокопенетрантными мутациями в генах BRCA1 и CHEK2. Из периферической венозной крови выделяют ДНК. Проводят анализ генов BRCA1 и CHEK2, а именно полиморфных локусов BRCA1insC5382, BRCA1 185delAG, BRCA1 2080delA, CHEK2 I157T, полиморфизма rs1940475 гена MMP8. Протективным фактором развития рака молочной железы у женщин с

высокопенетрантными мутациями в генах BRCA1 и CHEK2, а именно в полиморфных локусах BRCA1insC5382, BRCA1 185delAG, BRCA1 2080delA, CHEK2 I157T, является генотип TT полиморфизма rs1940475 гена MMP8. Способ обеспечивает получение новых критериев оценки низкого риска развития рака молочной железы у женщин русской национальности, уроженок Центрально-Черноземного региона РФ с высокопенетрантными мутациями в генах BRCA1 и CHEK2, а именно в полиморфных локусах BRCA1insC5382, BRCA1 185delAG, BRCA1 2080delA, CHEK2 I157T, на основе данных о полиморфизме rs1940475 гена MMP8. 5 ил., 4 пр.

(56) (продолжение):

http://rrmedicine.ru/media/medicine/2022/2/Биомедицинские_исследования_16.06.pdf; дата размещения подтверждена по адресу Web-архива URL: http://web.archive.org/web/20220617164852/http://rrmedicine.ru/media/medicine/2022/2/%D0%91%D0%B8%D0%BE%D0%BC%D0%B5%D0%B4%D0%B8%D1%86%D0%B8%D0%BD%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B5_%D0%B8%D1%81%D1%81%D0%BB%D0%B5%D0%B4%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D1%8F_16.06.pdf). RU 2019145377 A, 01.07.2021. RU 2617936 C2, 28.04.2017. WANG K. et al. MMP8 and MMP9 gene polymorphisms were associated with breast cancer risk in a Chinese Han population. Sci Rep. 2018; 8: 13422.

R U 2 7 9 8 6 6 6 C 1

R U 2 7 9 8 6 6 6 C 1



(51) Int. Cl.
G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
C12Q 1/6827 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/58 (2023.05); G01N 33/57415 (2023.02); C12Q 1/6806 (2023.02); C12Q 1/6827 (2023.02); C12Q 1/686 (2023.02); C12Q 1/6876 (2023.02); C12Q 1/6886 (2023.02)

(21)(22) Application: 2022128623, 03.11.2022

(24) Effective date for property rights:
03.11.2022

Registration date:
23.06.2023

Priority:

(22) Date of filing: 03.11.2022

(45) Date of publication: 23.06.2023 Bull. № 18

Mail address:

308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.
Pobedy, 85, NIU "BelGU", OIS, Shevtsovoj I.V.

(72) Inventor(s):

Churnosov Mikhail Ivanovich (RU),
Pavlova Nadezhda Vitalevna (RU),
Elykova Anna Vladimirovna (RU)

(73) Proprietor(s):

federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)

(54) **METHOD OF PREDICTING A LOW RISK OF DEVELOPING BREAST CANCER IN WOMEN WITH HIGHLY PENETRATING MUTATIONS IN THE BRCA1 AND CHEK2 GENES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; clinical oncology; medical genetics; molecular diagnostics.

SUBSTANCE: invention can be used to predict a low risk of developing breast cancer in Russian women with highly penetrating mutations in the BRCA1 and CHEK2 genes. DNA from the peripheral venous blood is isolated. The BRCA1 and CHEK2 genes are analyzed, namely the BRCA1insC5382, BRCA1 185delAG, BRCA1 2080delA, CHEK2 I157T polymorphisms, and the rs1940475 polymorphism of MMP8 gene. A protective factor in the development of breast cancer in women with highly penetrate mutations in the BRCA1 and CHEK2 genes, namely in the

polymorphic loci BRCA1insC5382, BRCA1 185delAG, BRCA1 2080delA, CHEK2 I157T, is TT genotype of rs1940475 polymorphism of MMP8 gene.

EFFECT: method provides for obtaining new criteria for assessing the low risk of developing breast cancer in Russian women, natives of the Central Black Earth region of the Russian Federation with highly penetrating mutations in the BRCA1 and CHEK2 genes, namely in the polymorphic loci BRCA1insC5382, BRCA1 185delAG, BRCA1 2080delA, CHEK2 I157T, based on data on the rs1940475 polymorphism of MMP8 gene.

1 cl, 5 dwg, 4 ex

R U 2 7 9 8 6 6 6 C 1

R U 2 7 9 8 6 6 6 C 1

Изобретение относится к области медицины, в частности к клинической онкологии, медицинской генетике, молекулярной диагностике и может быть использовано для прогнозирования риска развития рака молочной железы у женщин с высокопенетрантными мутациями в генах BRCA1 и CHEK2, а именно в полиморфных локусах BRCA1insC5382, BRCA1 185delAG, BRCA1 2080delA, CHEK2 I157T на основе данных о полиморфизме rs1940475 гена MMP8.

Рак молочной железы (PMЖ) является злокачественной опухолью, которая формируется из эпителиальных структур молочной железы [Gradishar W.J., Anderson B.O., Blair S.L. et al. Breast cancer version 3.2014 // J Natl Compr Cane Netw. 2014. V.12. №4. P.542-590.]. Согласно опубликованным в 2020 г. данным Международного агентства по изучению рака PMЖ является наиболее часто диагностируемым раком у женщин в сравнении со всеми другими разновидностями онкопатологии - на его долю приходится 24,5% и ежегодно в мире регистрируется 2,3 миллиона новых случаев заболевания [Ferlay J. , Colombet M., Soerjomataram I. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview // Int. J. Cancer. 2021. V.149. P.778-789. doi: 10.1002/ijc .33588.]. В структуре смертности женского населения в мире в целом удельный вес PMЖ составляет 15,5% (ежегодно данная патология является причиной смерти 685 тыс. женщин) [Sung H., Ferlay J. , Siegel R.L. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // CA Cancer J. Clin. 2021. V.71. P. 209-249. doi: 10.3322/caac.21660.].

Согласно материалам официальной статистики, представленным Росстатом РФ [Здравоохранение в России. 2021: Стат.с б .Росстат. М., 3-46 2021. 171 с.], в России за последние 15 лет наблюдается существенный рост (на 4 9%) количества пациентов с установленным впервые в жизни диагнозом PMЖ с 49,5 тыс. человек в 2005 г до и 73,9 тысяч человек в 2019 г. Следует отметить, что PMЖ является ведущей онкологической патологией у женского населения РФ - он занимает первое место как в структуре онкозаболеваемости женщин (20,9%), так и в структуре причин смерти женщин от онкопатологии (16,18%) [Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2018 году. М., 2019. 250 с.].

Роль наследственных факторов в формировании PMЖ не вызывает сомнений: считается что порядка 30% всех случаев заболевания имеют наследственную природу. Однако конкретные генетические факторы, определяющие развитие PMЖ, до конца не определены [Lilyquist J. , Ruddy K.J., Vachon C.M., Couch F.J. Common Genetic Variation and Breast Cancer Risk-Past, Present, and Future // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2018. V. 27. №4. P.380-394. doi:10.1158/1055- 9965.EPI-17-1144]. Известные к настоящему времени мутации в генах предрасположенности PMЖ с выраженной пенетрантностью (BRCA1/2, CHEK2, PALB2, ATM и др.) [Валова Я.В., Мингажева Э.Т., Прокофьева Д. С. и др. Рак яичников в составе наследственных онкологических синдромов (обзор) // Научные результаты биомедицинских исследований. 2021. Т.7. №4. С.330-362. DOI : 10.18413/2658-6533-2021-7-4-0-2] определяют около 5% случаев заболевания и они выявляются лишь у 1/3 больных (30-40%) имеющих отягощенный семейный анамнез. Проведенные многочисленные полно-геномные исследования (GWAS) по поиску полиморфных вариантов генов-кандидатов, вовлеченных в формирование заболевания, показали связь с PMЖ около 200 полиморфных локусов [<https://www.ebi.ac.uk/gwas/search?query=breast%20carcinoma>], которые определяют порядка 18% его наследуемости [Michailidou K., Lindström S., Dennis J. et al. Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci // Nature. 2017. V. 551(7678). P.92-94. doi:10.1038/nature24284], что существенно меньше возможно вклада наследственных факторов в подверженность к заболеванию,

достигающего 31% [Mucci L.A, Hjelmborg J.B., Harris J.R. et al. Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries // JAMA. 2016. V.315(1). P.68-76. doi:10.1001/jama.2015.17703].

Одной из «перспективных» для исследования групп генов-кандидатов РМЖ являются гены матриксных металлопротеиназ (ММП), белковые продукты которых - матриксные металлопротеиназы, имеют «ключевое» значение в патофизиологии заболевания. ММП являются цинк-зависимыми эндопептидазами, они продуцируются опухолевыми и стромальными клетками, «активно» участвуют в процессах деградации экстрацеллюлярного матрикса и базальной мембраны, влияя тем самым на рост опухоли, ангиогенез, метастазирование [Eiro N., Gonzalez L.O., Fraile M. et al. Breast Cancer Tumor Stroma: Cellular Components, Phenotypic Heterogeneity, Intercellular Communication, Prognostic Implications and Therapeutic Opportunities // Cancers (Basel). 2019. V.11 (5). P.664. doi:10.3390/cancers11050664]. Показана значительно более высокая продукция ММП (ММП2, ММП9 и др.) в опухолевых клетках при РМЖ в сравнении с «нормальными» клеткам молочной железы [Przybylowska K., Kluczna A., Zadrozny M. et al. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer // Breast Cancer Res Treat. 2006. V.95(1). P.65–72.].

Связь функционально значимого полиморфизма генов ММП (ММП1, ММП2, ММП9, др.) с риском развития РМЖ активно изучается различными научными коллективами. При этом несмотря на значительный накопленный фактический материал по этой теме, следует констатировать, что эти данные нередко не согласуются между собой, в ряде случаев они противоречивы, а по отдельным локусам (например, rs17577 ММП9, rs1940475 ММП8 и др. [Krivoshei, I.V., Altuchova, O.B., Golovchenko, O.V., et al. Genetic factors of hysteryomyoma (2015) Research Journal of Medical Sciences, 9 (4), pp. 182-185.]) – единичны и фрагментарны.

Одной из важных задач современной онкологии является изучение причин и механизмов развития рака молочной железы, среди которых значимую роль играют генетические факторы.

В Российской Федерации исследования вовлеченности гена ММП-8 в формирование предрасположенности к РМЖ на основе данных о полиморфизме rs1940475 гена ММП8 единичны и фрагментарны, а данные о развитии РМЖ у женщин с высокопенетратными мутациями в генах BRCA1 и CHEK2 на основе данных о полиморфизме rs1940475 гена ММП8 отсутствуют.

Для оценки сложившейся патентной ситуации был выполнен поиск по охраняемым документам за период с 1990 по 2022 гг. Анализ документов производился по направлению: способ прогнозирования риска развития рака молочной железы у женщин с высокопенетратными мутациями в генах BRCA1 и CHEK2, а именно полиморфных локусов BRCA1insC5382, BRCA1 185delAG, BRCA1 2080delA, CHEK2 I157T на основе данных о полиморфизме rs1940475 гена ММП8.

Источники информации: сайты Федерального института промышленной собственности <http://fips.ru>.

В изученной научно-медицинской и доступной патентной литературе авторами не было обнаружено способа прогнозирования риска развития РМЖ у женщин с высокопенетратными мутациями в генах BRCA1 и CHEK2, а именно полиморфных локусов BRCA1insC5382, BRCA1 185delAG, BRCA1 2080delA, CHEK2 I157T на основе данных о полиморфизме rs1940475 гена ММП8.

Известен патент RU № 2741232 (опубл. 22.01.2022), в котором описан способ прогнозирования прогрессирования рака молочной железы, включающий определение

в периферической крови промежуточного метаболита витамина D 25(OH)D. При значении его содержания в сыворотке крови $\leq 18,9$ нг/мл прогнозируют прогрессирование заболевания. Способ обеспечивает повышение точности прогнозирования прогрессирования рака молочной железы за счет определения промежуточного метаболита витамина D 25(OH)D в венозной крови, проявляющееся в снижении показателя промежуточного метаболита витамина D 25(OH)D, предшествующем прогрессированию заболевания. Недостатком этого способа является трудоемкость выполнения и кроме того не учитывается роль генетических полиморфизмов.

Известен патент RU №2336822 (опубл. 27.08.2008), в котором описан способ прогнозирования рака молочной железы, включающий исследование крови пациента. Дополнительно при обследовании определяют показатели: возраст, социальный статус, сопутствующие заболевания, количество моноцитов крови, скорость оседания эритроцитов (СОЭ), общий билирубин крови, креатинин крови, удельный вес мочи, реакцию мочи. Затем определяют прогностический коэффициент (ПК) для каждого показателя. В системе возраст при маркере до 20 лет устанавливают ПК равным (0), при маркере 20-29 лет - равным (-10), при маркере 30-39 лет - равным (-7), при маркере 40-49 лет - равным (+4), при маркере 50-59 лет - равным (+3), при маркере 60-69 лет - равным (+2), при маркере 70-79 лет - равным (+4), при маркере 80 и более лет - равным (-3). В системе социальный статус при маркере рабочие устанавливают ПК равным (+4), при маркере служащие - равным (-1), при маркере учащиеся - равным (0), при маркере безработные - равным (-12), при маркере пенсионеры и инвалиды труда (ИТР) - равным (+1). В системе сопутствующие заболевания при маркере заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) устанавливают ПК равным (-10), при маркере заболевания сердечно-сосудистой системы - равным (+2), при маркере заболевания эндокринной системы - равным (+1,5), при маркере заболевания дыхательной системы - равным (0), при маркере заболевания опорно-двигательного аппарата - равным (0), при маркере заболевания мочеполовой системы - равным (-13), при маркере сочетание сопутствующий заболеваний - равным (-1), при маркере отсутствие сопутствующих заболеваний - равным (+2). В системе моноциты крови при маркере нет устанавливают ПК равным (0), при маркере 1-3% - равным (-2,5), при маркере 4-6% - равным (+2), при маркере 7-10% - равным (+2,5), при маркере более 10% - равным (0). В системе скорость оседания эритроцитов при маркере - 1-10 мм/ч устанавливают ПК равным (-1), при маркере 11-20 мм/ч - равным (-3), при маркере 21-30 мм/ч - равным (+7), при маркере 31-40 мм/ч - равным (0), при маркере более 40 мм/ч - равным (0). В системе общий билирубин при маркере менее 8,8 мкмоль/л устанавливают ПК равным (0), при маркере 8,8-17 мкмоль/л - равным (-1), при маркере более 17 мкмоль/л - равным (+5,5). В системе креатинин при маркере менее 0,07 ммоль/л устанавливают ПК равным (+11), при маркере 0,07-0,17 - равным (-3), при маркере более 0,17 мкмоль/л - равным (0). В системе удельный вес мочи при маркере менее 1008 устанавливают ПК равным (0), при маркере 1008-1026 - равным (+2), при маркере более 1026 - равным (+6). В системе реакция мочи при маркере кислая, устанавливают ПК равным (+3), при маркере нейтральная - равным (-3), при маркере щелочная - равным (-12). При сумме ПК от (-54,5) до (-21,5) прогнозируют низкую вероятность рака молочной железы, при сумме от (+11) до (+44,5) прогнозируют высокую вероятность рака молочной железы. Однако прогнозирование таким способом рака молочной железы сопряжено с профилактическими осмотрами, при этом диспансеризация лиц из групп повышенного риска должна проводиться длительное время вплоть до возраста 55 лет.

Известен патент RU №2263319 (опубл. 27.10.2005), в котором описан способ прогнозирования рецидива рака молочной железы, включающий биохимическое исследование биологической жидкости пациента, отличающийся тем, что у менопаузальных женщин после комплексного лечения рака молочной железы в динамике определяют концентрацию эстриола, эстрогена и эстрадиола в моче, вычисляют соотношение эстриола к эстрогену и эстрадиолу и при значении его $1,68 \pm 0,23$ констатируют отсутствие рецидива, а при его снижении до значений $0,74 \pm 0,12$ у пациенток, проживающих без рецидива менее 1 года, до $0,65 \pm 0,13$ у пациенток, проживших без рецидива от 2 до 6 лет, и до $0,50 \pm 0,10$ у пациенток, проживших без рецидива от 6 до 10 лет, констатируют развитие рецидива. Недостатком данного способа является высокая стоимость анализа, что особенно важно при его многократном повторении в ходе наблюдения за больными после комплексного лечения.

Патент RU №2522501 (опубл. 20.07.2014), в котором описан способ прогнозирования наследственной предрасположенности к раку молочной железы. Сущность способа заключается в том, что проводят амплификацию коротких фрагментов гена BLM протяженностью до 200 п.о., с последующим высокоразрешающим плавлением, включающим оптимизированный для гена BLM этап формирования гетеродуплексов: быстрый нагрев до 95°C и медленное снижение температуры до 50°C ; выбирают один фрагмент с абберрантным профилем плавления для секвенирования, секвенируют выбранный фрагмент и при выявлении мутации гена BLM прогнозируют наследственную предрасположенность к раку молочной железы. Недостатком этого способа является его трудоемкость, он не учитывает роль генетических полиморфизмов.

Известен патент RU №2204836 (опубл. 20.05.2003), в котором описан способ прогнозирования генерализации рака молочной железы. В данном способе проводят диагностическое наблюдение больных раком молочной железы. Определяют тромбоцитарную активность MAO-B в плазме крови, что обеспечивает доклиническое выявление генерализации рака молочной железы. При снижении тромбоцитарной активности MAO-B в 4-6 раз по отношению к норме прогнозируют генерализацию процесса. Недостатком предлагаемого способа является использование в качестве маркера только одного показателя - тромбоцитарной активности MAO-B в плазме крови, применение способа в отношении уже больных раком молочной железы, преимущественная информативность предлагаемого показателя тромбоцитарной активности MAO-B в период генерализации процесса при наличии отдаленных метастазов, что делает невозможным применение способа в ранней диагностике рака молочной железы.

Известен патент RU №2631940 (опубл. 28.09.2017), в котором описан способ прогнозирования рака молочной железы. Сущность способа заключается в том, что определяют факторы риска: ношение тугого бюстгалтера (Б), возраст (В), перенесенные воспалительные заболевания молочной железы (ЗМЖ), перенесенные заболевания щитовидной железы (ЗЩЖ), индекс массы тела (ИМТ), частое употребление жирной, жареной и копченой пищи (Калл), некормление ребенка грудью (НКГ), кормление ребенка грудью год и более (КГ^1 год), позднее наступление менструации (ПНМ), длительное проживание в военных городках (ПВО), перенесенные травмы молочной железы (ТМЖ). Отсутствие каждого из указанных факторов оценивают как «0 баллов», а наличие - «1 балл». Показатели ПНМ, В, ИМТ оценивают количественно. Рассчитывают прогностический коэффициент ПК по заявленной формуле. Если значение ПК меньше 0,2197, то прогнозируют низкий риск, а если ПК от 0,2197 и более - высокий риск рака молочной железы. Недостатком способа является сложность расчетов и не

учитываются генетические факторы.

Прогнозирование риска рака молочной железы на основе естественных исследований // Зиннатуллина Г.Ф., Бермишева М.А., Кононова В.А., Фарахтдинова А.Р., Хуснутдинова Э.К. // Креативная хирургия и онкология. 2009. №2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/prognozirovanie-vozniknoveniyariska-raka-molochnoy-zhelezy-na-osnove-geneticheskikh-issledovaniy> (дата обращения: 24.07.2022), характеризуется проведением анализа распространенности двух вариантов гена NBN (с.657del5 и р.Р215W) у больных раком молочной железы в Республике Башкортостан и Ханты-Мансийском автономном округе. Недостатком данного исследования является применение только для коренных жителей Республики Башкортостан и Ханты-Мансийского автономного округа.

Задачей настоящего исследования является расширение арсенала методов диагностики, а именно создание способа прогнозирования низкого риска развития рака молочной железы у женщин с высокопенетратными мутациями в генах BRCA1 и CHEK2, а именно в полиморфных локусах BRCA1insC5382, BRCA1 185delAG, BRCA1 2080delA, CHEK2 I157T на основе данных о полиморфизме rs1940475 гена MMP8.

Технический результат использования изобретения – получение критериев оценки низкого риска развития рака молочной железы у женщин русской национальности, уроженок Центрально – Черноземного региона РФ с высокопенетратными мутациями в генах BRCA1 и CHEK2, а именно в полиморфных локусах BRCA1insC5382, BRCA1 185delAG, BRCA1 2080delA, CHEK2 I157T на основе данных о полиморфизме rs1940475 гена MMP8, включающий:

- выделение ДНК из периферической венозной крови;
- анализ генов BRCA1 и CHEK2, а именно полиморфных локусов BRCA1insC5382, BRCA1 185delAG, BRCA1 2080delA, CHEK2 I157T полиморфизма rs1940475 гена MMP8;
- прогнозирование низкого риска развития рака молочной железы у женщин с высокопенетратными мутациями в генах BRCA1 и CHEK2, а именно в полиморфных локусах BRCA1insC5382, BRCA1 185delAG, BRCA1 2080delA, CHEK2 I157T при выявлении генотипа ТТ полиморфизма rs1940475 гена MMP8.

Новизна и изобретательский уровень заключаются в том, что из уровня техники не известна возможность прогноза низкого развития рака молочной железы у женщин с высокопенетратными мутациями в генах BRCA1 и CHEK2, а именно в полиморфных локусах BRCA1insC5382, BRCA1 185delAG, BRCA1 2080delA, CHEK2 I157T на основе данных о генотипе ТТ полиморфизма rs1940475 гена MMP8.

Способ осуществляют следующим образом:

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществляют методом фенольно-хлороформной экстракции (Miller, S. A. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells / S. A. Miller, D. D. Dykes, H. F. Polesky // Nucleic Acids. Res. – 1988. – Vol. 16, № 3. – P. 1215) в два этапа. На первом этапе к 4 мл крови с ЭДТА добавляют 25 мл лизирующего буфера, содержащего 320мМ сахарозы, 1% тритон Х-100, 5мМ MgCl₂, 10мМ трис-НСl (рН=7,6). Полученную смесь перемешивают и центрифугируют при 4°C, 4000 об./мин. в течение 20 минут. После центрифугирования надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 4 мл раствора, содержащего 25 мМ ЭДТА (рН=8,0) и 75 мМ NaCl, ресуспензируют. Затем прибавляют 0,4 мл 10% SDS, 35 мкл протеиназы К (10мг/мл) и инкубируют образец при 37°C в течение 16 часов.

На втором этапе из полученного лизата последовательно проводят экстракцию ДНК равными объемами фенола, фенол-хлороформа (1:1) и хлороформа с центрифугированием при 4000 об./мин. в течение 10 минут. После каждого

центрифугирования производят отбор водной фазы. ДНК осаждают из раствора двумя объемами охлажденного 96% этанола. После лиофилизации полученную ДНК растворяют в бидистиллированной, деионизованной воде и хранят при -20°C .

5 Анализ полиморфных локусов BRCA1insC5382, BRCA1 185delAG, BRCA1 2080delA, CHEK2 I157T и гена MMP8 осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на термоциклере CFX-96 Real-Time System (Bio-Rad) с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов (синтезированы в ООО «Тест - Ген» (Ульяновск)).

10 Амплификация геномной ДНК производилась в реакционной смеси, суммарным объемом 10 мкл, включающей смесь для ПЦР – 4 мкл, Taq-полимеразу - 2 мкл, исследуемый образец (~30 нг ДНК/мкл) - 1 мкл, деионизованная вода – 3мкл.

Генотипирование исследуемых образцов осуществлялось с использованием программного обеспечения «CFX-Manager™» методом дискриминации аллелей по величинам относительных единиц флуоресценции (ОЕФ) (фиг. 1, фиг. 2, фиг. 3, фиг. 4, 15 фиг. 5).

Изобретение характеризуется фигурами:

Фиг. 1. Дискриминация аллелей по локусу BRCA1 5382insC (где ● - гомозиготы C/C, ▲ - гетерозиготы C/insC, ◆ - неопределённый образец)

20 Фиг. 2. Дискриминация аллелей по локусу BRCA1 185 delAG (где ● - гомозиготы AG/AG, ▲ - гетерозиготы AG/delAG, ◆ - неопределённый образец)

Фиг. 3. Дискриминация аллелей по локусу BRCA1 2080delA (где ● - гомозиготы A/A, ▲ - гетерозиготы A/delA, ◆ - неопределённый образец)

25 Фиг. 4. Дискриминация аллелей по локусу CHEK2 I157T (где ● - гомозиготы I/I, ▲ - гетерозиготы I/T, ◆ - неопределённый образец).

Фиг. 5. Дискриминация аллелей по локусу MMP8 rs1940475 (где ● - гомозиготы T/T, ▲ - гетерозиготы C/T, ■ - гомозиготы C/C, ◆ - неопределённый образец).

30 Определение частот генотипов и анализ ассоциаций с развитием РМЖ у женщин проводилось с помощью логистического регрессионного анализа в программе PLINK (версия 1.07) [Ponomarenko, I.V., Polonikov, A.V., Churnosov, M.I. Association of ESR2 RS4986938 polymorphism with the development of endometrial hyperplasia (2019) Akusherstvo i Ginekologiya (Russian Federation), 2019 (4), pp. 66-72.]. При необходимости в исследование включали ковариаты (возраст, индекс массы тела). После проведения пермутационного 35 теста (выполнялось 1000 пермутаций) за статистически значимый уровень принимали $P_{perm} < 0,05$.

40 Возможность использования предложенного способа для оценки прогнозирования риска развития РМЖ у женщин с высокопенетрантными мутациями в генах BRCA1 и CHEK2 подтверждает анализ результатов наблюдений сформированный из следующих трех выборок: 26 больных РМЖ, имеющие высокопенетрантные мутации в генах BRCA1 (с.5266dup (5382insC), с.68_69del (185delAG), 2080delA) и CHEK2 (I157T)), 332 больных РМЖ без герминальных мутаций в генах BRCA1 (с.5266dup (5382insC), с.68_69del (185delAG), 2080delA, 4153delA), BRCA2 (6174delT) и CHEK2 (I157T) и 746 женщин 45 контрольной группы. Следует отметить, что среди 26 больных РМЖ, имеющих высокопенетрантные мутации в генах BRCA1 и CHEK2 (доля этой группы пациентов среди всех больных РМЖ (n=358) равна 7,26 %), генетический вариант с.5266dup (5382insC) BRCA1 встречался у 22 пациенток (6,14 % среди всех больных РМЖ, n=358), мутация с.68_69del (185delAG) BRCA1 была выявлена у 1 женщины (0,28 %), мутация

2080delA BRCA1 диагностирована у 1 пациентки (0,28 %) и мутация I157T CHEK2 установлена у 2 женщин (0,56 %). При описании результатов работы для характеристики рассматриваемых групп больных РМЖ мы использовали термины «больные РМЖ, имеющие/не имеющие высокопенетрантные мутации в генах BRCA1 и CHEK2». Средний возраст больных составил 54,74±12,73 лет (варьировал от 25 до 84 лет). Возрастные характеристики больных и контроля были сопоставимы. В выборки для исследования включались (критерии включения): 1) пациентки русской национальности, являющиеся уроженками Центрального Черноземья РФ, не имеющие родства между собой и проживающие в Белгородской области (Чурносов М.И., Сорокина И.Н., Балановская Е.В. Генофонд населения Белгородской области. Динамика индекса эндогамии в районных популяциях // Генетика. 2008. Т. 44. № 8. С. 1117-1125), добровольно согласившиеся на проведение исследования; 2) в группу больных включались пациентки только после установления диагноза заболевания РМЖ, подтвержденного с помощью клинических и лабораторно-инструментальных (в т.ч. морфологических) методов обследования.

Обследование больных РМЖ проводилось на базе поликлинического и химиотерапевтического отделений Белгородского областного онкологического диспансера; формирование контрольной группы (без клинико-анамнестических признаков РМЖ) проводилось на базе перинатального центра БОКБ Святителя Иоасафа (в ходе проф. осмотра).

Все больные РМЖ и женщины контрольной группы подписали информированное согласие на участие в исследовании (проведение исследования было согласовано с этическим комитетом медицинского института НИУ «БелГУ»).

Типирование молекулярно-генетических маркеров осуществлялось на кафедре медико-биологических дисциплин медицинского института НИУ «БелГУ».

При расчете частот генотипов и анализе их ассоциаций у пациенток установлена связь с формированием РМЖ у женщин с высокопенетрантными мутациями в генах BRCA1 и CHEK2, а именно полиморфных локусов BRCA1insC5382, BRCA1 185delAG, BRCA1 2080delA, CHEK2 I157T генотипа ТТ полиморфного локуса MMP8 rs1940475. Генотип ТТ согласно рецессивной генетической модели полиморфного локуса MMP8 rs1940475 имеет протективное значение для развития РМЖ у женщин с высокопенетрантными мутациями в генах BRCA1 и CHEK2, а именно полиморфных локусов BRCA1insC5382, BRCA1 185delAG, BRCA1 2080delA, CHEK2 I157T (OR=0,11).

В качестве примеров конкретного применения разработанного способа приведено обследование русских женщин, уроженок Центрально-Черноземного региона РФ и не являющихся родственницами между собой с высокопенетрантными мутациями в генах BRCA1 и CHEK2, а именно полиморфных локусов BRCA1insC5382, BRCA1 185delAG, BRCA1 2080delA, CHEK2 I157T проведено генетическое исследование по гену MMP8 полиморфизма rs1940475.

У пациентки П. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен генотип AG/delAG гена BRCA1 185delAG и генотип ТТ гена MMP8 rs1940475, что позволило отнести пациентку в группу женщин с низким риском развития РМЖ с высокопенетрантными мутациями. При дальнейшем наблюдении диагноз рака молочной железы у пациентки П. не подтвердился.

У пациентки О. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен генотип AG/delAG гена BRCA1 185delAG и генотип СС гена MMP8 rs1940475, что позволило отнести пациентку в группу с повышенным риском развития РМЖ у женщин с высокопенетрантными мутациями. Дальнейшее наблюдение

подтвердило диагноз рака молочной железы у пациентки О.

У пациентки М. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен генотип $-/insC$ гена $BRCA1insC5382$ и генотип ТТ гена $MMP8 rs1940475$, что позволило отнести пациентку в группу больных с пониженным риском развития РМЖ с высокопенетратными мутациями. Дальнейшее наблюдение не подтвердило диагноз рака молочной железы у пациентки.

У пациентки Ж. была взята венозная кровь, при генотипировании ДНК-маркеров был выявлен $-/insC$ гена $BRCA1insC5382$ и генотип СС гена $MMP8 rs1940475$, что позволило отнести пациентку в группу индивидуумов с повышенным риском развития РМЖ у женщин с высокопенетратными мутациями. При дальнейшем наблюдении диагноз рака молочной железы у пациентки Ж. подтвердился.

Применение данного способа позволит на доклиническом этапе формировать среди пациенток группы риска и своевременно реализовывать в этих группах необходимые лечебно-профилактические мероприятия по предупреждению развития РМЖ у женщин с высокопенетратными мутациями в генах $BRCA1$ и $CHEK2$, а именно в полиморфных локусах $BRCA1insC5382$, $BRCA1 185delAG$, $BRCA1 2080delA$, $CHEK2 I157T$.

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования низкого риска развития рака молочной железы у женщин русской национальности с высокопенетратными мутациями в генах $BRCA1$ и $CHEK2$ на основе данных о полиморфизме $rs1940475$ гена $MMP8$, включающий выделение ДНК из периферической венозной крови, анализ генов $BRCA1$ и $CHEK2$, а именно полиморфных локусов $BRCA1insC5382$, $BRCA1 185delAG$, $BRCA1 2080delA$, $CHEK2 I157T$, полиморфизма $rs1940475$ гена $MMP8$, при этом протективным фактором развития рака молочной железы у женщин с высокопенетратными мутациями в генах $BRCA1$ и $CHEK2$, а именно в полиморфных локусах $BRCA1insC5382$, $BRCA1 185delAG$, $BRCA1 2080delA$, $CHEK2 I157T$, является генотип ТТ полиморфизма $rs1940475$ гена $MMP8$.

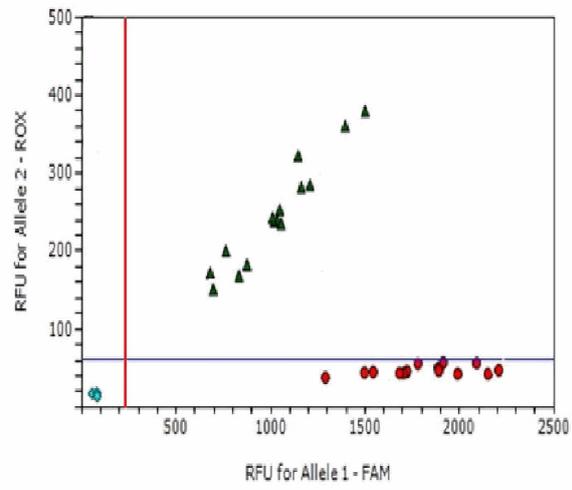
30

35

40

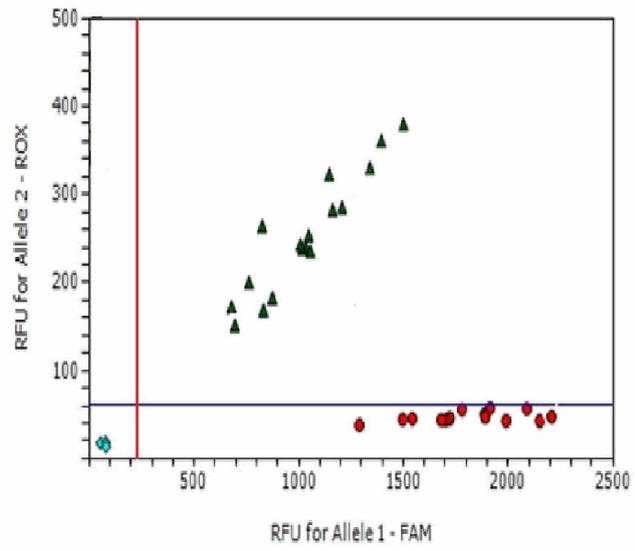
45

1

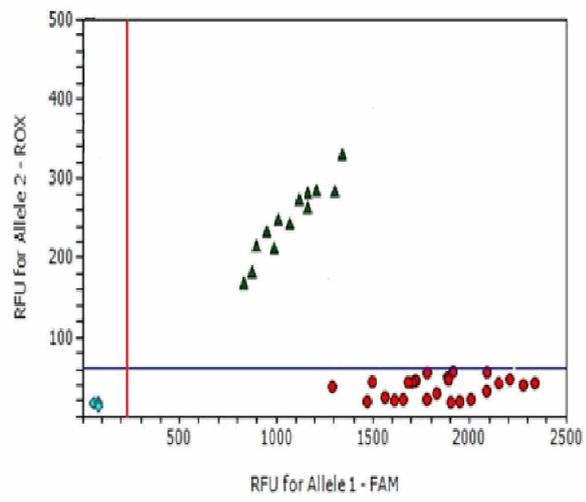


Фигура 1

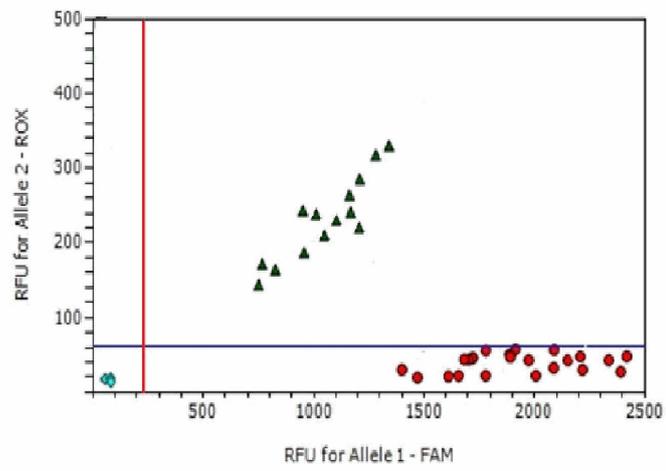
2



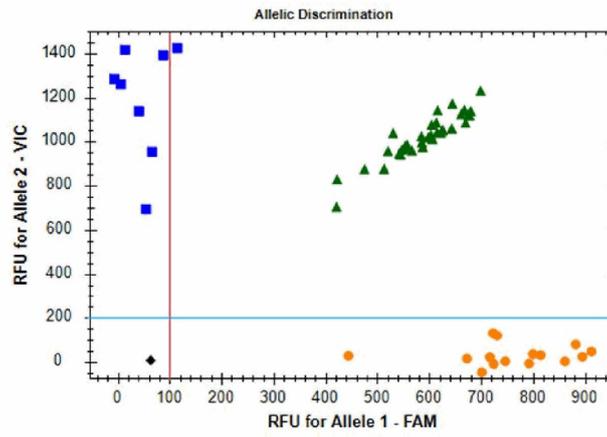
Фигура 2



Фигура 3



Фигура 4



Фигура 5