

**ОПИСАНИЕ
ИЗОБРЕТЕНИЯ
К ПАТЕНТУ**

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **21127**

(13) **С1**

(46) **2017.06.30**

(51) МПК

A 61B 10/00 (2006.01)

G 01N 33/50 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ НАЛИЧИЯ МУТАЦИИ
В ГЕНАХ BRCA У ПАЦИЕНТКИ С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

(21) Номер заявки: а 20131623

(22) 2013.12.30

(43) 2015.08.30

(71) Заявители: Курстак Ирина Андреевна; Ляликов Сергей Александрович; Савицкий Святослав Эдуардович; Кузнецов Олег Евгеньевич (ВУ)

(72) Авторы: Курстак Ирина Андреевна; Ляликов Сергей Александрович; Савицкий Святослав Эдуардович; Кузнецов Олег Евгеньевич (ВУ)

(73) Патентообладатели: Курстак Ирина Андреевна; Ляликов Сергей Александрович; Савицкий Святослав Эдуардович; Кузнецов Олег Евгеньевич (ВУ)

(56) ANTONIOU A.C. et al. British Journal of Cancer. - 2004. - V. 91. - P. 1580-1590.

ANTONIOU A.C. et al. Journal of Medical Genetics. - 2008. - V. 45. - P. 425-431.

RU 2408022 C1, 2010.

САВИЦКИЙ С.Э. и др. Актуальные проблемы патологической анатомии. Материалы Республиканской научно-практической конференции. - Гродно, 2010. - С. 121-123.

SCHMUTZLER R.K. et al. European Journal of Cancer Prevention. - 2006. - V. 15. - P. 483-489.

(57)

Способ прогнозирования наличия мутации в генах BRCA у пациентки с раком молочной железы, включающий установление наличия или отсутствия среди родственников I-II степени родства случаев рака молочной железы, **отличающийся** тем, что дополнительно определяют в опухолевой ткани доли клеток, экспрессирующих CD3 и CD8, и распространенность первичной опухоли по классификации TNM, после чего рассчитывают показатель у по формуле:

$$y = -0,137 \cdot m_1 - 0,069 \cdot m_2 + 5,302 \cdot m_3 - 3,071 \cdot m_4 + 14,0,$$

где m_1 - доля клеток, экспрессирующих CD3, %,

m_2 - доля клеток, экспрессирующих CD8, %,

$m_3 = 1$ при наличии рака молочной железы среди родственников I-II степени родства, $m_3 = 0$ при его отсутствии,

$m_4 = 1$ при распространенности первичной опухоли T1,

$m_4 = 2$ при распространенности первичной опухоли T2,

$m_4 = 3$ при распространенности первичной опухоли T3,

$m_4 = 4$ при распространенности первичной опухоли T4,

и при значении у, равном 0 или менее, прогнозируют наличие мутации в генах BRCA у пациентки с раком молочной железы.

Изобретение относится к медицине, а именно к клинической лабораторной диагностике, и может использоваться для прогнозирования наличия мутаций в гене BRCA у пациен-

ВУ 21127 С1 2017.06.30

ток с раком молочной железы, производить отбор лиц для молекулярногенетического обследования и формировать группу риска, состоящую из здоровых лиц (кровных родственников пациентов с раком молочной железы), с наследственной предрасположенностью к раку молочной железы и в данной группе проводить мероприятия, направленные на предупреждение развития и раннее выявление онкологической патологии.

В 2011 году в Беларуси выявлено 44109 лиц с впервые в жизни установленным диагнозом злокачественного новообразования. Среди женского населения республики наиболее часто встречается рак молочной железы (РМЖ). Заболеваемость данной онкопатологией в 2011 составила 76,7 вновь выявленных случаев на 100 тысяч женского населения [5].

Иммунные нарушения при злокачественных новообразованиях молочной железы отмечаются многими авторами, проводившими исследования в данной области. Главную роль в противоопухолевом иммунитете играет клеточный иммунный ответ, ключевыми участниками которого являются CD8⁺-цитотоксические Т-лимфоциты и NK-клетки, которые оказывают прямое (индуцируя апоптоз или выделяя перфорина и гранзим В) или не прямое (секретируя цитокины) цитотоксическое действие на клетки-мишени [3]. По результатам проводимых исследований группой авторов установлена связь Т-клеточной инфильтрации опухоли при раке молочной железы с регионарным метастазированием, увеличение количества интратуморальных Т-киллеров - с благоприятным прогнозом для пациентов, преимущественно без регионарного метастазирования. Российскими авторами отмечено, что при выраженной лимфоидной инфильтрации опухолевой ткани выше эффективность лечения пациентов с РМЖ [1].

Большую роль в развитии РМЖ играют факторы внешней среды и особенности функционирования репродуктивной системы. Однако по литературным данным от 10 до 60 % диагностированного рака молочной железы относятся к наследственным формам [6].

Герминальные мутации в генах BRCA обуславливают наследственную предрасположенность к РМЖ. Эти гены высоко пенетрантны: по данным американских авторов вероятность развития РМЖ у женщин-носительниц мутаций в гене BRCA1 на протяжении жизни составляет 80-85 %.

Для установления диагноза наследственный РМЖ необходимы молекулярно генетические методы. Полноценная диагностика BRCA мутаций пока остается малодоступной для практической медицины. Стоимость секвенирования участка гена BRCA длиной около 20000 пар нуклеотидов с учетом трудозатрат и дорогостоящего оборудования составляет примерно 2000-3000 долларов США за 1 анализ, поэтому учеными разных стран на протяжении последних десяти лет формулировались критерии для выявления лиц с риском развития наследственного РМЖ.

Известен способ прогнозирования мутации в генах BRCA по наличию двух и более родственниц, страдающих раком органов женской репродуктивной системы любой локализации [2].

Недостатком является экспертная оценка отягощенного семейного онкологического анамнеза пациенток с РМЖ, не подтвержденная статистическим анализом.

Известен способ прогнозирования наследственного РМЖ по более раннему возрасту манифестации заболевания и первичной множественности новообразований у пациентки [4].

Недостатком является отсутствие оценки связи наличия мутации в генах BRCA у пациенток с раком молочной железы с клиническими и морфологическими особенностями опухоли.

Наиболее близким к заявляемому является способ прогнозирования мутации в генах BRCA у пациенток с РМЖ по наличию в семье среди родственниц I-II степени родства рака молочной железы и/или рака яичника [7].

Недостатком данного способа прогнозирования мутаций является то, что анализ частоты встречаемости мутаций проводился в рамках одного региона и не подтвержден многоцентровыми исследованиями.

BY 21127 C1 2017.06.30

Задача изобретения - разработать способ прогнозирования мутации в генах BRCA у пациенток с раком молочной железы по клиническим и морфологическим признакам опухоли с целью отбора лиц для молекулярно-генетического обследования.

Поставленная задача решается путем установления наличия или отсутствия среди родственников I-II степени родства пациентки с раком молочной железы случаев рака молочной железы, при этом отличительным моментом является то, что дополнительно определяют в опухолевой ткани долю клеток, экспрессирующих CD3 и CD8, и распространенность первичной опухоли по классификации TNM, после чего рассчитывают показатель y по формуле:

$$y = -0,137 \cdot m_1 - 0,069 \cdot m_2 + 5,302 \cdot m_3 - 3,071 \cdot m_4 + 14,0,$$

где m_1 - доля клеток, экспрессирующих CD3, %,

m_2 - доля клеток, экспрессирующих CD8, %,

$m_3 = 1$ при наличии рака молочной железы среди родственников I-II степени родства,

$m_3 = 0$ при его отсутствии,

$m_4 = 1$ при распространенности первичной опухоли T1,

$m_4 = 2$ при распространенности первичной опухоли T2,

$m_4 = 3$ при распространенности первичной опухоли T3,

$m_4 = 4$ при распространенности первичной опухоли T4,

и при значении y , равном 0 или менее, прогнозируют наличие мутации в генах BRCA у пациентки с раком молочной железы.

Способ осуществляют следующим образом. У пациентки с опухолью молочной железы по результатам анкетирования определяют наличие или отсутствие случаев рака молочной железы в роду среди родственников I-II степени родства (m_3), оценивают выраженность экспрессии в опухолевой ткани молочной железы показателей местного иммунитета CD3 (m_1) и CD8 (m_2) и учитывают оценку первичной опухоли молочной железы согласно Международной клинической классификации TNM (m_4). Затем определяют показатель y по формуле:

$$y = -0,137 \cdot m_1 - 0,069 \cdot m_2 + 5,302 \cdot m_3 - 3,071 \cdot m_4 + 14,0,$$

где m_1 - доля клеток, экспрессирующих CD3, %,

m_2 - доля клеток, экспрессирующих CD8, %,

$m_3 = 1$ при наличии рака молочной железы среди родственников I-II степени родства,

$m_3 = 0$ при его отсутствии,

$m_4 = 1$ при распространенности первичной опухоли T1,

$m_4 = 2$ при распространенности первичной опухоли T2,

$m_4 = 3$ при распространенности первичной опухоли T3,

$m_4 = 4$ при распространенности первичной опухоли T4,

и при значении y , равном 0 или менее, прогнозируют наличие мутации в генах BRCA у пациентки с раком молочной железы.

Способ был разработан на основе дискриминантного анализа результатов иммуногистохимического исследования срезов тканей опухоли 30 пациенток с раком молочной железы с использованием моноклональных и поликлональных антител компании "DAKO", Дания (CD3-лимфоцитов - Polyclonal Rabbit Cion AO452, CD8 - Monoclonal Mouse Cion DO-7). Всем пациенткам было выполнено ДНК-тестирование образцов крови на наличие мутаций в генах BRCA1 (185delAG, 300T > G, 4153delA, 5382insC) и BRCA2 (6174delT) методом полимеразно-цепной реакции (праймеры "Праймтех", Беларусь) и по результатам анкетирования было проанализировано наличие рака молочной железы среди родственников I-II степени родства на протяжении четырех поколений.

Комплексная оценка показателей местного иммунитета, клинических особенностей течения рака молочной железы, отягощенного онкологического анамнеза с подтвержден-

ными результатами молекулярно-генетического исследования, проводилась с помощью дискриминантного анализа. Построение многофакторной математической модели прогнозирования мутации в генах BRCA у пациенток с раком молочной железы проводилось с использованием дискриминантного анализа (прямым пошаговым методом).

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием пакета прикладных программ Statistica 10.0, серийный номер AXAR207F394425FA-Q.

При построении модели прогнозирования мутации в генах BRCA у пациенток с раком молочной железы было установлено, что из общего числа изученных факторов достоверно влияют на прогноз 4 наиболее значимых (табл. 1). Классификационная функция, полученная с использованием указанных переменных, представлена в табл. 2, классификационная матрица - в табл. 3.

Анализ классификационной матрицы, значение Wilks' - Lambda, равное 0,35990, значение F-критерия, равного 5,3357, при $p < 0,01$ позволяют сделать вывод, что данная классификация является корректной. Чувствительность предлагаемой дискриминантной модели составляет 83,3 %, специфичность - 95,8 %. Прогностическая значимость положительного результата - 83,3 %. Прогностическая значимость отрицательного результата - 95,8 %. Общая прогностическая значимость (диагностическая эффективность) - 93,3 %.

Таблица 1

Результаты анализа дискриминантных функций прогнозирования мутации в генах BRCA у пациенток с раком молочной железы

Независимые признаки	Wilks' - Lambda	F-remove	p-level
Доля клеток, экспрессирующих CD3, %	0,49	4,22	0,06
Доля клеток, экспрессирующих CD8, %	0,40	1,21	0,29
Наличие/отсутствие в семейном анамнезе случаев заболеваний родственников РМЖ	0,43	2,34	0,15
T, по классификации TNM	0,44	2,75	0,12

Таблица 2

Функции классификации для модели прогнозирования мутации в генах BRCA у пациенток с раком молочной железы

Переменные	Коэффициенты
Доля клеток, экспрессирующих CD3, %	-0,137
Доля клеток, экспрессирующих CD8, %	-0,069
Наличие/отсутствие в семейном анамнезе случаев заболеваний родственников РМЖ	5,302
T, по классификации TNM	-3,071
Константа	14,0

Таблица 3

Матрица классификации прогнозирования мутации в генах BRCA у пациенток с раком молочной железы как результат применения линейной дискриминантной функции

Наблюдаемое состояние	Доля правильных прогнозов	Прогнозируемое состояние	
		Благоприятный исход	Неблагоприятный исход
Наличие мутации	83,3 %	5	1
Отсутствие мутации	95,8 %	1	23
Всего	93,3 %	6	24

Приводим примеры, подтверждающие возможность осуществления изобретения.

Пример 1.

Пациентка Г., 49 лет. По результатам проведенного анкетирования у пациентки в роду среди родственников I-II степени родства был рак молочной железы, согласно Международной клинической классификации TNM опухоль молочной железы соответствовала T1, при оценке выраженности экспрессии факторов интратуморального иммунного ответа в опухолевой ткани процент клеток с фенотипом CD3 + составил 30 %, CD8 + - 0 %.

Расчет дискриминантного уравнения:

$$y = -0,137 \cdot 30 - 0,069 \cdot 0 + 5,302 \cdot 1 - 3,071 \cdot 1 + 14,0 = 12,121.$$

$y = 12,121$, т.е. более 0, поэтому прогнозируется рак молочной железы у пациентки, не обусловленный мутацией в генах BRCA. По результатам молекулярно-генетического исследования на наличие мутаций в генах BRCA у данной пациентки мутация не обнаружена.

Пример 2.

Пациентка С., 33 года. По результатам проведенного анкетирования в роду раком молочной железы страдала только сама пациентка, согласно Международной клинической классификации TNM опухоль молочной железы соответствовала T2, при оценке выраженности экспрессии факторов интратуморального иммунного ответа в опухолевой ткани процент клеток с фенотипом CD3 + составил 40 %, CD8 + - 40 %.

Расчет дискриминантного уравнения:

$$y = -0,137 \cdot 40 - 0,069 \cdot 40 + 5,302 \cdot 0 - 3,071 \cdot 2 + 14,0 = -0,382.$$

$y = -0,382$, т.е. менее 0, поэтому прогнозируется мутации в генах BRCA у пациентки с раком молочной железы. По результатам молекулярно-генетического исследования на наличие мутаций в генах BRCA у данной пациентки была выявлена мутация 5382insC в 20 экзоне гена BRCA1. Таким образом, отмечается совпадение прогнозируемого и наблюдаемого наличия мутации в генах BRCA у данной пациентки, которая обуславливает наследственный генез РМЖ.

Приведенные примеры подтверждают высокую эффективность предлагаемого способа. Предлагаемый способ позволяет прогнозировать наличие мутации в генах BRCA у пациентки с раком молочной железы по клиническим и морфологическим признакам опухоли, производить отбор пациенток для молекулярно-генетического обследования, а также позволяет формировать группу риска, состоящую из здоровых лиц (кровных родственников пациентов с раком молочной железы) с наследственной предрасположенностью к раку молочной железы, для проведения в данной группе мероприятий, направленных на предупреждение развития и раннее выявление онкологической патологии.

Источники информации:

1. Субботина А.А. и др. Анализ результатов неoadьювантного лечения больных с учетом иммунофенотипических особенностей рака молочной железы // Опух. женской репрод. системы. - 2008. - № 4. - С. 31-34.
2. Залуцкий И.В., Антоненкова Н.Н., Порубова Г.М. Принципы организации и методы выявления лиц, имеющих наследственную предрасположенность к злокачественным новообразованиям. Инструкция по применению. Регистрационный номер № 026-0507. - Минск: ГУ "НИИ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова", 2007. - С. 3-4.
3. Шамилов Ф.А. и др. Изучение субпопуляций интратуморальных лимфоцитов у больных раком молочной железы // Онкогинекология. - 2012. - № 4. - С. 56.

ВУ 21127 С1 2017.06.30

4. Имянитов Е.Н. Скрининг для лиц с наследственной предрасположенностью к раку // *Практ. онкология*. - 2010. - № 2. - С. 105.

5. Океанов А.Е., Моисеев П.И., Левин Л.Ф. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь (2002 - 2011) / Под ред. О.Г.Суконко. - Минск: РНПЦ ОМР им. Н.Н.Александрова, 2012. - 333 с.

6. Hartman A. The problems with risk selection; scientific and psychosocial aspects // *Recent Results Cancer Res.* - 2005. - Vol. 166. - P. 125.

7. Schmutzler R.K. et al. Outcome of a structured surveillance programme in women with a familial predisposition for breast cancer // *Eur. J. Cancer Prev. Int.* - 2006. - Vol. 15(6). - P 483.

Репозиторий ГрГМУ