



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **75385** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A61B 10/00
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 06984	(72) Винахідник(и): Левкович Наталія Миколаївна (UA), Горовенко Наталія Григорівна (UA), Подольська Світлана Володимирівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 07.06.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.11.2012	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.11.2012, Бюл.№ 22	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕНЕТИЧНОЇ ТА РЕГЕНЕРАТИВНОЇ МЕДИЦИНИ НАМН УКРАЇНИ", вул. Вишгородська, 67, м. Київ, 04114 (UA)

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РОЗВИТКУ РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ У ЖІНОК З ОБТЯЖЕНОЮ СПАДКОВІСТЮ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування розвитку раку грудної залози включає клініко-генеалогічний аналіз. Після визначення обтяженості родоводу, здійснюють забір біологічної рідини та виконують молекулярно-генетичне дослідження поліморфізму G1934A гена CYP2D6 і при наявності генотипу *4*4 (A1934A) гена CYP2D6 свідчать про підвищення ризику розвитку раку грудної залози.

U
UA 75385

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до молекулярної генетики та онкології й може бути використана у практиці для прогнозування розвитку раку грудної залози у жінок з обтяженою спадковістю.

Рак грудної залози (РГЗ) є найбільш частою онкологічною патологією, в економічно розвинених країнах він уражає, як мінімум, кожную десятку жінок. Серед основних причин зростання числа хворих на РГЗ, частіше за все називають старіння населення, пролонговану дію естрогенів і порушення в системі підтримання стабільності геному.

Серед відомих способів прогнозування РГЗ слід відмітити проведення клінічних обстежень, визначення кластерів диференціювання лейкоцитів, імунорегуляторного індексу, визначення домінантних і рецесивних ознак людини [Патент № 39342 U UA, МПК А61В 8/00. Опубл. 25.02.2009, бюл. № 4] та використання генно-інженерних конструкцій [Патент № 39342 С2 UA, МПК С12Q 1/68 G01N 33/574. Опубл. 25.02.2009, бюл. № 3]. Недоліками вищезазначених методів є їх трудоємність, висока вартість досліджень та потреба в спеціалістах, що мають високу кваліфікацію.

Як прототип вибраний спосіб прогнозування ризику розвитку злоякісних новоутворень [Патент № 68920 U UA, МПК(2012.01) А61В 10/00. Опубл. 10.04.2012, бюл. № 7], що включає проведення клінічних обстежень, клініко-генеалогічного та генетико-математичного аналізу родоводів у хворій на рак ендометрію і визначення ризику розвитку злоякісних новоутворень у сібсів пробанда.

Ознаками, які збігаються з істотними ознаками запропонованого у прототипі способу, є використання клініко-генеалогічного аналізу.

Причинами, які перешкоджають досягненню очікуваного технічного результату, є високий ступінь суб'єктивізму, адже основою способу є опитування вже хворої жінки, і має цінність, як діагностичний критерій, лише для її родичів, так як автори не приводять даних по застосуванню цього способу у здорових жінок.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб прогнозування розвитку раку грудної залози у жінок з обтяженою спадковістю шляхом визначення генотипу за поліморфним варіантом G193 4A (алель *4) гена CYP2D6, що дозволяє оцінити на ранньому етапі (ще до виникнення РГЗ чи захворювань, що йому передують) ризик розвитку даної патології та використовувати превентивні міри для його запобігання чи виявлення на ранніх стадіях.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі, що включає клініко-генеалогічний аналіз, згідно з корисною моделлю, після визначення обтяженості родоходу, здійснюють забір біологічної рідини та виконують молекулярно-генетичне дослідження поліморфізму G1934A гена CYP2D6 і при наявності генотипу *4*4 (A1934A) гена CYP2D6 свідчать про підвищення ризику розвитку раку грудної залози.

До даного рішення автори прийшли, досліджуючи внесок генетичної компоненти в ризик розвитку РГЗ. Виявлено, що велика кількість досліджень присвячена пошуку асоціацій ризику виникнення РГЗ й індивідуальних особливостей системи ферментів, що приймають участь в метаболізмі канцерогенів. Перспективними є дослідження, присвячені генетичному поліморфізму ферментів, що приймають участь в метаболізмі гормонів, оскільки доведено спадкову природу гормонального портрету кожної конкретної жінки і незаперечну роль гіперестрогенії в розвитку РГЗ.

Одним з ферментів, який приймає участь в метаболізмі естрогенів є дебризокін-4-гідроксилаза (CYP2D6) - фермент І фази детоксикації ксенобіотиків, що кодується геном CYP2D6, який локалізований на хромосомі 22q13.1. (OMIM * 124030). Серед білого європейського населення в гені CYP2D6 найбільш часто виявляють заміну G1934A (алель *4) на межі інтрона 3 і екзона 4, наявність якої приводить до некоректного сплайсингу мРНК, в результаті чого відбувається здвиг рамки зчитування, передчасне завершення трансляції й утворення дефектного білкового продукту, позбавленого ферментативної активності.

Спосіб здійснюється таким чином:

Проводиться клініко-генеалогічне дослідження методом опитування з наступним аналізом родоводів для визначення обтяженої спадковості.

У осіб з обтяженістю родоводів онкологічною патологією проводиться подальше молекулярно-генетичне дослідження алелей поліморфної ділянки G1934A гена CYP2D6.

Для проведення молекулярно-генетичних досліджень використовується біологічний матеріал, а саме венозна кров, що зберігається в закритих системах з ЕДТА при температурі - 20 °С.

Виділення геномної ДНК проводиться з лейкоцитів замороженої крові з використанням комерційного набору "ДНК-сорб-В" (ЦНДІ Епідеміології Міністерства охорони здоров'я РФ) або

за альтернативними методиками виділення нуклеїнових кислот. Об'єм біологічного матеріалу для виділення ДНК - 0,1 мл.

Процедуру виділення ДНК проводять поетапно, згідно з інструкцією виробника.

5 Генотипування за алельним варіантом G1934A (*4) гена CYP2D6 проводили методами полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і рестрикційного аналізу (поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів - ПДРФ). Алельний варіант *4 гена CYP2D6 досліджували з використанням послідовностей праймерів: 5'-GCCTTCGCCAACCCTCCG-3' і 5'-AAATCCTGCTCTTCCGAGGC-3'. Умови ПЛР: ДНК денатурували протягом 3 хв при +94 °C і 30 циклів: плавлення - 94 °C - 40 сек., відпал 60 °C - 40 сек., синтез 72 °C - 40 сек.; пролонгований синтез 72 °C - 5 хв. Реакцію ампліфікації проводили в термоциклері фірми Applied Biosystems (Великобританія).

10 Продукти ампліфікації, довжиною 421 пара нуклеотидів (п.н.), піддавали рестрикції шляхом додавання в рестрикційну суміш аліквот продуктів ПЛР об'ємом 2,5 мкл і 7 одиниць активності ендонуклеази рестрикції BstNI (Mval) з подальшою інкубацією при 37 °C протягом 2-х годин. Детекцію продуктів ампліфікації та ПДРФ проводили в 2 % агарозному гелі, що містив 18 мкл етидію броміду. Візуалізацію результатів здійснювали в ультрафіолетовому світлі за допомогою автоматичної системи відеозчитування. Довжини фрагментів аналізували шляхом порівняння з маркерною ДНК.

20 Гомозиготи за CYP2D6*4 (A1934A - *4*4) діагностували за наявністю двох фрагментів довжиною 77 і 344 пар нуклеотидів (п.н.), а гомозиготи за "диким типом" (G1934G - *1*1) - за наявністю трьох фрагментів довжиною 77, 161 і 183 п.н. Гетерозиготи (G1934A - *1*4) мали чотири фрагменти довжиною 77, 161, 183 і 344 п.н.

Після отримання результатів генотипування, генотип за алельним варіантом G1934A гена CYP2D6 зіставляють з даними генеалогічного аналізу і прогнозують ризик виникнення РГЗ.

25 Запропонованим способом було обстежено 85 пацієнтів у віці від 18 до 80 років (середній вік - 45,25±13,26 років) з гістологічно підтвердженим діагнозом РГЗ I і II стадій, які проходили лікування в Київській міській онкологічній лікарні. Всім хворим проводили клініко-генеалогічне дослідження методом опитування з наступним аналізом родоводів. За результатами клініко-генеалогічного дослідження всіх хворих на РГЗ було розділено на 2 підгрупи. Група Ia - 67 хворих, які мали серед родичів I-II ступеня спорідненості 2 і більше хворих на РГЗ (спадковість обтяжена). Група Ib - 18 хворих, які не мали родичів з онкологічними захворюваннями (спадковість не обтяжена). Контрольна група була представлена жителями України (n=637, середній вік 50,73±19,3 років).

35 Результати було проаналізовано з використанням пакету статистичних програм Statistica 6.0. Для визначення вірогідності різниці частот генотипів в групах, що порівнювались використовували стандартний критерій χ^2 -квадрат (χ^2). Відношення шансів Odds Ratio (OR) оцінювалось для розрахунку відносного ризику розвитку хвороби для кожного генотипу. Для всіх видів аналізу статистично значимими вважали значення $p < 0,05$.

40 В результаті генотипування за поліморфним варіантом G1934A гена CYP2D6 нами було виявлено частоти генотипів для груп дослідження, що представлені в таблиці 1.

При порівнянні загальної групи жінок з РГЗ (Група I) з контрольною групою ми отримали вірогідну різницю в частотах генотипів і алелів для генотипів *1*1 (G1934G) і *4*4 (A1934A) гена CYP2D6, що проілюстровано в таблиці 2.

45 При роздільному аналізі розподілення генотипів і алелів за CYP2D6 у хворих на РГЗ з обтяженою спадковістю і групою контролю, було отримано збільшення ризику розвитку РГЗ у жінок підгрупи Ia з генотипом *4*4, не лише по відношенню до контролю, але і до показників в загальній групі хворих РГЗ (OR 3,59 і 2,77 відповідно) (таблиці 2 і 3).

50 Це свідчить про підвищений ризик розвитку РГЗ у хворих з обтяженою спадковістю в порівнянні з групою контролю. Частота генотипу *1*4 (G1934A) виявилась підвищеною в групі жінок з сімейною історією раку (41,79 %). Наявність генотипу *1*1 (G1934G) може мати протективну дію, про що свідчить показник OR.

При порівнянні даних отриманих для групи з необтяженою спадковістю (група Ib) та іншими групами дослідження, нами не було отримано вірогідних відмінностей в частотах алелів і генотипів гена CYP2D6.

55 Технічним результатом, що досягається запропонованим способом, є прогнозування ризику розвитку РГЗ у жінок з обтяженою спадковістю, що дозволяє, за допомогою клініко-генеалогічного та молекулярно-генетичного обстеження на ранньому етапі (ще до виникнення РГЗ чи захворювань, що йому передують) інформативно прогнозувати ризик розвитку РГЗ та сформулювати відповідні групи ризику за даною патологією.

60

Таблиця 1

Розподіл генотипів і алелів за CYP2D6 в групах дослідження

		*1*1 (G1934G)		4*4 (G1934A)		*4*4 (A1934A)		*1*4+*4*4		Частота алелів	
		n	%	n	%	n	%	n	%	p(*1)	q(*4)
Група І n=85		45	52,94	34	40	6	7,06	40	47	0,73	0,27
Група І	Група Іа n=67	33	49,25	28	41,79	6	8,96	34	51	0,7	0,3
	Група Ів n=18	12	66,67	6	33,33	0	0	6	50	0,83	0,17
Група контролю n=637		417	65,46	203	31,87	17	2,67	220	34	0,81	0,19

Таблиця 2

Росподілення генотипів і алелів за геном CYP2D6 в групах I і II

Поліморфізм гена	Генотипи, алелі	Група І n=85		Група контролю n=637		χ^2	OR	CI
		n	%	n	%			
CYP2D64	G1934G (*1*1)	45	52,94	417	65,46	5,1	0,59	0,38-0,94
	G1934A (*1*4)	34	40,00	203	31,87	2,25	1,43	0,9-2,27
	A1934A (*4*4)	6	7,06	17	2,67	4,69	2,77	1,06-7,23
	p(*1)	0,73		0,81		6,81	0,62	0,43-0,89
	q(*4)	0,27		0,19			1,62	1,12-2,34

Таблиця 3

Поліморфізм гена CYP2D6 у хворих з обтяженою спадковістю

Поліморфізм гена	Генотипи, алелі	Група Ia n=67		Група контролю n=637		χ^2	OR	CI
		n	%	n	%			
CYP2D6*4	G1934G (*1*1)	33	49,25	417	65,46	6,91	0,51	0,31-0,85
	G1934A (4*4)	28	41,79	203	31,87	2,71	1,53	0,92-2,56
	A1934A (*4*4)	6	8,96	17	2,67	7,58	3,59	1,36-9,44
	p(*1)	0,7		0,81		9,71	0,54	0,36-0,8
	q(*4)	0,3		0,19			1,86	1,25-2,77

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

Спосіб прогнозування розвитку раку грудної залози, що включає клініко-генеалогічний аналіз, який **відрізняється** тим, що після визначення обтяженості родоходу, здійснюють забір біологічної рідини та виконують молекулярно-генетичне дослідження поліморфізму G1934A гена CYP2D6 і при наявності генотипу *4*4 (A1934A) гена CYP2D6 свідчать про підвищення ризику розвитку раку грудної залози.

10

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601