

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2661599

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАЗВИТИЯ РЕЦИДИВОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ТЕЛА МАТКИ НА ОСНОВАНИИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ESR1

Патентообладатель: *федеральное государственное бюджетное учреждение "Ростовский научно-исследовательский онкологический институт" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Кит Олег Иванович (RU), Водолажский Дмитрий Игоревич (RU), Моисеенко Татьяна Ивановна (RU), Кутилин Денис Сергеевич (RU), Вереникина Екатерина Владимировна (RU), Франциянц Елена Михайловна (RU)*

Заявка № 2017132251

Приоритет изобретения 14 сентября 2017 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 17 июля 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 14 сентября 2037 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/50 (2018.02); C12Q 1/686 (2018.02); C12Q 1/6886 (2018.02); C12Q 2539/00 (2018.02)

(21)(22) Заявка: 2017132251, 14.09.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.09.2017

Дата регистрации:
17.07.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 14.09.2017

(45) Опубликовано: 17.07.2018 Бюл. № 20

Адрес для переписки:

344037, г. Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63,
РНИОИ, Ишониной О.Г.

(72) Автор(ы):

Кит Олег Иванович (RU),
Водолажский Дмитрий Игоревич (RU),
Моисеенко Татьяна Ивановна (RU),
Кутилин Денис Сергеевич (RU),
Вереникина Екатерина Владимировна (RU),
Франциянц Елена Михайловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
учреждение "Ростовский
научно-исследовательский онкологический
институт" Министерства здравоохранения
Российской Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2611352 C1, 21.02.2017. RU
2250077 C2, 20.04.2005. RU 2605302 C1,
20.12.2016. БОЖЕНКО В.К. и др. Профиль
экспрессии генов как фактор прогноза при
пролиферативных заболеваниях органов
репродуктивной системы // Вестник
Российского научного центра
рентгенодиагностики Минздрава России,
2012, N 12, стр.1-44.

(54) ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАЗВИТИЯ РЕЦИДИВОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ
ТЕЛА МАТКИ НА ОСНОВАНИИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ESR1

(57) Реферат:

Изобретение относится к молекулярной биологии, онкологии и биотехнологии. Тест-система для прогнозирования рецидивов у больных раком тела матки на основании уровня экспрессии гена ESR1 содержит контрольные смеси и смесь для ПЦР-РВ реакции, включающую 1 mM dNTPs, 12,5 mM MgCl₂, 5-кратный ПЦР-буфер с 5-кратным красителем EvaGreen Dye,

ДНК-полимеразу *Thermus aquaticus* в количестве 5 ед/мкл и высокоспецифичные олигонуклеотидные праймеры для генов ESR1 и АСТВ. Изобретение обеспечивает простоту и точность прогнозирования рецидивов у пациенток с диагнозом рак тела матки без использования дорогостоящего оборудования, а также высокую чувствительность и специфичность. 1 табл., 2 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 661 599**⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

G01N 33/50 (2018.02); *C12Q 1/686* (2018.02); *C12Q 1/6886* (2018.02); *C12Q 2539/00* (2018.02)

(21)(22) Application: 2017132251, 14.09.2017

(24) Effective date for property rights:
14.09.2017

Registration date:
17.07.2018

Priority:

(22) Date of filing: 14.09.2017

(45) Date of publication: 17.07.2018 Bull. № 20

Mail address:
344037, g. Rostov-na-Donu, 14-ya liniya, 63, RNIIOI,
Ishoninoj O.G.

(72) Inventor(s):

Kit Oleg Ivanovich (RU),
Vodolazhskij Dmitrij Igorevich (RU),
Moiseenko Tatyana Ivanovna (RU),
Kutlin Denis Sergeevich (RU),
Verenikina Ekaterina Vladimirovna (RU),
Frantsiyants Elena Mikhajlovna (RU)

(73) Proprietor(s):

federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
uchrezhdenie "Rostovskij
nauchno-issledovatel'skij onkologicheskij institut"
Ministerstva zdravookhraneniya Rossijskoj
Federatsii (RU)

(54) TEST-SYSTEM FOR PREDICTION OF RELAPSE DEVELOPMENT IN PATIENTS WITH UTERINE CORPUS CANCER BASED ON EXPRESSION LEVEL OF THE ESR1 GENE

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to molecular biology, oncology and biotechnology. Test-system for the prediction of relapses in patients with uterine corpus cancer, based on the level of expression of the ESR1 gene, contains control mixtures and a mixture for the real-time PCR reaction comprising 1 mM dNTPs, 12.5 mM MgCl₂, 5-fold PCR-buffer with 5-fold dye

EvaGreen Dye, DNA polymerase *Thermus aquaticus* in an amount of 5 U/ml and highly specific oligonucleotide primers for genes ESR1 and ACTB.

EFFECT: invention provides a simple and accurate prediction of relapse in patients diagnosed with uterine corpus cancer without the use of expensive equipment, as well as high sensitivity and specificity.

1 cl, 1 tbl, 2 ex

RU 2 661 599 C1

RU 2 661 599 C1

Изобретение относится к молекулярной биологии, онкологии и биотехнологии и может быть использовано для прогнозирования развития рецидивов по уровню относительной экспрессии гена ESR1 у больных раком тела матки.

5 Рак тела матки является самой распространенной злокачественной опухолью органов малого таза у женщин (см. World Cancer Report 2014. World Health Organization. Chapter 5.12.) и относится к гормонально-зависимым опухолям. Эндометрий, являясь «тканью-мишенью» для половых гормонов, чрезвычайно чувствителен к действию эстрогенов (см. Causes, Risk Factors, and Prevention TOPICS - Do we know what causes endometrial cancer? - cancer.org - American Cancer Society - Retrieved 5 January 2015).

10 Биологический эффект эстрогенов реализуется через их взаимодействие с эстрогенными рецепторами, которые, в свою очередь, активируют гены-мишени во многих тканях. Показано, что повышенная экспрессия гена ER α (ESR1) сопровождает процессы онкотрансформации во многих тканях (см. Bardin A., Boulle N., Lazennec G., Vignon F. Loss of ER β expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression // 15 Endocrine-Related Cancer. 2004. Vol.11. P. 537-551). Поэтому в качестве маркеров для прогнозирования рецидивов у больных раком тела матки адекватно использовать уровень относительной экспрессии гена эстрогенного рецептора α (ESR1).

Рецидивы являются одной из ведущих причин неудач в лечении рака тела матки и определяют неблагоприятный прогноз заболевания. Частота возникновения рецидивов 20 варьирует от 28 до 40% при железисто-плоскоклеточном раке и до 5-10% при высокодифференцированной аденокарциноме эндометрия (см. Урманчеева А.Ф., Ульрих Е.А., Нейштадт Э.Л. и др. Серозно-папиллярный рак эндометрия (клинико-морфологические особенности. Вопр. онкологии 2002; 48 (6): 679-83.). Более 80% рецидивов возникают в первые 2 года после радикального лечения (см. Кузнецов В.В., 25 Нечушкина В.М. Хирургическое лечения рака тела матки. Практ. онкология 2004; (17): 25-32.). С увеличением промежутка времени после операции прогрессивно снижается вероятность появления местного рецидива. По срокам клинического проявления рецидивы разделяют на ранние, установленные в первые 2 года после операции, и поздние, выявленные в срок более 2 лет (например, через 12 лет). Причинами 30 возникновения ранних рецидивов являются крайне агрессивное течение заболевания, имплантационный путь метастазирования, неадекватный объем хирургического вмешательства. Причины и сроки возникновения поздних рецидивов не определены и достаточно не изучены, но, скорее всего, зависят от биологических особенностей опухоли.

35 Анализ патентных источников показал наличие следующих (близких по тематике) изобретений.

1) «Способ прогнозирования выживаемости больных эндометриоидным раком тела матки» (см. патент RU №2299690 C1, опубл. 27.05.2007, Бюл. №15): на основе оценки исходного соматического состояния больной и ряда иммуногистохимических параметров 40 опухоли прогнозируется выживаемость больной эндометриоидным раком тела матки. В качестве иммуногистохимических параметров используются Ki-67 и HER2.

2) «Способ определения эффективности лечения рака тела матки» (см. патент RU №2424806 C1, опубл. 27.07.2011, Бюл. №21): на основе определения коэффициента соотношения тетрагидро-11-дезоксикортизола к кортизолу через 1,5-2 недели после 45 окончания лечения в суточной моче прогнозируют длительность безрецидивного периода.

3) «Способ прогнозирования развития рецидива при раке тела матки» (см. патент RU №2250077 C2, опубл. 20.04.2005, Бюл. №11): включает биохимическое исследование

в ткани злокачественной опухоли и эндометрия, при этом до и после проведения комплексного лечения определяют активности катепсина Д и кислотостабильных ингибиторов, рассчитывают коэффициент соотношения катепсина Д и кислотостабильных ингибиторов, и при уровне коэффициента, превышающем

показатели, характерные для ткани интактного эндометрия, более чем в 2,4-2,8 раза, прогнозируют развитие рецидива рака эндометрия в срок до 6 месяцев.

4) «Молекулярные маркеры для прогноза развития рака» (Заявка: 2011101382, опубли. 27.07.2012, Бюл. №21), включающий определение в биологическом образце уровня экспрессии множества генов: ACTG1, CA12, CALM2, CCND1, CHPT1, CLEC2B, CTSB, CXCL13, DCN, DHRS2, EIF4B, ERBB2, ESR1, FBX028, GABRP, GAPDH, H2AFZ, IGFBP3, IGHG1, IGKC, KCTD3, KIAA0101, KRT17, MLPH, MMP1, NAT1, NEK2, NR2F2, OAZ1, PCNA, PDLIM5, PGR, PPIA, PRC1, RACGAP1, RPL37A, SOX4, TOP2A, UBE2C и VEGF.

5) «Способ диагностики гиперпролиферативных состояний и оценки риска развития рака шейки матки при цервикальной интраэпителиальной неоплазии и папилломавирусном носительстве на основе определения уровней мРНК функционального комплекса генов человека» (Заявка: 2012113964, опубли. 20.10.2013, Бюл. №29). Для диагностики гиперпролиферативных состояний предлагается использовать следующие генетические маркеры: MKI67, CDKN2A, MYBL2, CCNB1, BIRC5, AURKA, ESR1, PGR, BCL2, BAX, BAG1, PTEN, CD68 и PTGS2.

Описанные изобретения используют либо более трудоемкие и сложные в анализе способы, либо обладают меньшей чувствительностью и специфичностью, чем предлагаемая нами тест-система.

Анализ патентных источников (www.fips.ru) также показал отсутствие действующих патентов и заявок на патент тест-системы для прогнозирования развития рецидивов у больных раком тела матки на основании уровня относительной экспрессии гена ESR1.

Изобретение «Тест-система для прогнозирования развития рецидивов у больных раком тела матки на основании уровня экспрессии гена ESR1» является новым, так как относительная экспрессия только данного гена ранее не использовалась для заявленной в способе цели, также как последовательность праймеров гена ESR1 и АСТВ в составе предлагаемой тест системы.

Техническим результатом заявляемого изобретения является создание и внедрение новой, простой в исполнении, не дорогостоящей и точной тест-системы с уникальными высокоспецифичными последовательностями синтетических олигонуклеотидов (праймеров) для прогнозирования рецидивов у пациенток с диагнозом рак тела матки.

Технический результат достигают тем, что используют смесь для ПЦР-РВ реакции: 1 мМ dNTPs, 12,5 мМ MgCl₂, 5-кратный ПЦР-буфер с 5-кратным красителем EvaGreen Dye, ДНК-полимеразу *Thermus aquaticus* 5 ед/мкл и высокоспецифичные праймеры для генов ESR1 и АСТВ, проводят две амплификации: контрольную и основную, анализируют первичные данные с помощью программного продукта амплификатора и рассчитывают относительную экспрессию генетического локуса ESR1 по формуле

$RE = 2^{-\Delta C_t}$ с последующим вычислением соотношения относительной экспрессии этого гена в опухолевой ткани относительно нормальной ткани матки по формуле $K = RE_{\text{cancer}} / RE_{\text{normal}}$, где К - коэффициент относительной экспрессии, RE_{cancer} - относительная экспрессия в опухолевой ткани, RE_{normal} - относительная экспрессия в условно

нормальной ткани, сравнивают полученные значения К с интервалом прогностического коэффициента экспрессии, и при значении $K_{\text{ESR1}} \leq 1$ прогнозируют течение заболевания без рецидивов, при значении $K_{\text{ESR1}} \geq 6$ развитие рецидивов, а при значениях коэффициента

К между указанными интервалами считают полученный результат неопределенным, при этом специфичные олигонуклеотидные праймеры для определения экспрессии гена ESR1: прямой TGGAGTCTGGCTCTGTGAGG, обратный CAATGGTGCACCTGGTTGGTG относительно гена АСТВ: прямой AACCGCGAGAAGATGACCC, обратный AGCACAGCCTGGATAGCAAC для предложенной выше тест-системы, последовательности которых подобраны с учетом сплайсинга мРНК.

Заявленный анализ основан на определении относительной экспрессии гена ESR1, предварительно нормализованного относительно референтного локуса АСТВ, и последующем вычислении соотношения экспрессии гена в опухолевой ткани по отношению к нормальной ткани: $K = E_{\text{cancer}} / E_{\text{normal}}$.

Заявленная тест-система включает следующие приемы: определение относительной экспрессии генетических локусов методом ПЦР-РВ в присутствии флуоресцентного красителя EvaGreen Dye и специфичных праймеров на матрице синтезированной кДНК; анализ первичных данных с помощью программного продукта амплификатора; расчет экспрессии гена на основании соотношения сигналов, продуцируемых ампликонами изучаемой и референсной последовательностей, и обработка данных на соответствие значениям коэффициентов экспрессии, характерным для групп пациенток с течением заболевания с рецидивами и без.

Заявленная тест-система, рассчитанная на 50 реакций, включает:

1. Смесь для ПЦР-РВ реакции (Mix_PCR) - 1200 мкл, содержащую 1 мМ dNTPs, 12,5 мМ MgCl₂, 5-кратный ПЦР-буфер с 5-кратной концентрацией красителя EvaGreen Dye.
2. ДНК-полимеразу *Thermus aquaticus* 5 ед/мкл (Taq) - 50 мкл.
3. Смесь прямого и обратного праймеров с концентрацией 5 мкМ каждого для гена ESR1 (ESR1_Mix) - 100 мкл.
4. Смесь прямого и обратного праймеров с концентрацией 5 мкМ каждого для гена АСТВ (Ref_Mix)) - 300 мкл.
5. Контроль реакционной смеси (стандартная кДНК с концентрацией 2 нг/мкл) - 1000 мкл.
6. NTC (контроль без матрицы, Milli-Q вода обработанная DEPC) - 1000 мкл.
7. Milli-Q-DEPC-H₂O (Milli-Q вода обработанная DEPC) - 2000 мкл.

Из расчета на одну ПЦР-РВ реакцию смесь должна содержать перечисленные выше компоненты в следующем соотношении:

4 мкл Mix_PCR + 0,2 мкл Taq + 2 мкл ESR1_Mix (или Ref_Mix) + 6 мкл матрицы* + 7,8 мкл Milli-Q-DEPC-H₂O

* - кДНК или РНК нормализованная до концентрации 2 нг/мкл, NTC или контроль реакционной смеси.

Для тест-системы были разработаны специфичные олигонуклеотидные прямые и обратные праймеры для генов ESR1 и АСТВ. Дизайн специфичных олигонуклеотидных праймеров (таблица 1) осуществлялся с использованием референсных последовательностей NCBI GenBank на основе следующих принципов: область отжига олигонуклеотидных праймеров должна быть в диапазоне 58-63°C; GC-состав в диапазоне 40-60%; в последовательности праймера должны отсутствовать стабильные вторичные структуры - шпильки и димеры, e-value последовательности праймера должно стремиться к нулю и быть не больше 0,05, а query coverage (покрытие целевой последовательности) 100% (для версии BLASTN 2.3.1+), температуры отжига праймеров (forward и reverse) не должны различаться друг от друга более чем на 0,5°. Также при подборе праймеров учитывался сплайсинг мРНК. Так для гена АСТВ прямой праймер покрывает

последовательность в конце 3 экзона, а обратный праймер - последовательность в начале 4 экзона.

Таблица 1

Тест-система для прогнозирования развития рецидивов у больных раком тела матки на основании уровня экспрессии гена *ESR1*

Наименование праймеров	№ NCBI GenBank	Хромосомная локализация	Последовательность	Т отжига, °C
ESR1_F ESR1_R	NM_001122741.1	6q25.1	TGGAGTCTGGCTCTGTGAGG CAATGGTGCACTGGTTGGTG	60
ACTB_F ACTB_R	NM_001101.3	7p22	AACCGCGAGAAGATGACCC AGCACAGCCTGGATAGCAAC	60

Работу с тест-системой, содержащей разработанные специфичные олигонуклеотидные праймеры, осуществляют следующим образом.

На первом этапе отбирают образцы тканей пациенток - опухолевые и условно здоровые, из операционного или биопсийного материала. Образцы для транспортировки в лабораторию и хранения замораживают в жидком азоте.

Фрагменты ткани измельчают (скальпелем, ножницами или др. способом), гомогенизируют (напр., растирают в фарфоровых ступках) в присутствии лизирующего раствора ингибирующего активность РНКаз (напр., содержащего 4М гуанидин тиоцианат, саркозил и 2-меркаптоэтанол). Дальнейшее выделение РНК из тканей проводят любым доступным методом (рекомендуется метод гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции по P. Chomczynski & N. Sacchi (2006)).

Выделенная РНК обрабатывается ДНКазой. Перед проведением реакции обратной транскрипции для проверки качества выделенной РНК проводят электрофорез в 2% геле агарозы по методу Masek T. et al. (см. Masek T., Vopalensky V., Suchomelova P., Pospisek M. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels.//Anal Biochem. - 2005 - 336 (1) - P.46-50.). Также перед проведением реакции обратной транскрипции измеряют концентрацию полученных препаратов РНК (любым доступным методом) и нормализуют ее до 2 нг/мкл.

Синтез кДНК можно проводить с использованием коммерческих наборов, основанных на применении обратной транскриптазы M-MuLV Reverse Transcriptase и случайных праймеров (random hexamer). Реакцию обратной транскрипции проводят при 37°C в течение 30 минут.

Полученную кДНК нормализуют до 2 нг/мкл. Реагенты для выделения РНК, синтеза кДНК, определения концентрации РНК и кДНК, проведения электрофорез не входят в состав тест-системы.

Для выполнения анализа необходимо провести две амплификации (реакции ПЦР-РВ). В первой проверяется качество кДНК и чистота препарата тотальной РНК. Реакция проводится с использованием смеси праймеров для АСТВ.

Дальнейшее использование кДНК в тест-системе возможно, если соблюдаются следующие условия:

- 1) $St_{АСТВ}$ для образца кДНК не превышает 28 цикла.
- 2) разница $St_{АСТВ}$ между образцом кДНК и РНК должна быть не меньше 5 циклов.
- 3) $St_{АСТВ}$ контроля реакционной смеси должно быть не выше 24 цикла.
- 4) $St_{АСТВ}$ для НТС должен отсутствовать.

Во второй амплификации определяется уровень сигналов, продуцируемых

амплификатами локусов ESR1 и референсного АСТВ в нормальной и опухолевой ткани.

Анализируемые последовательности генетических локусов амплифицировали в 20 мкл ПЦР-смеси, содержащей 12 нг кДНК, 0,20 мМ dNTPs, 2,5 мМ MgCl₂, 1× ПЦР-буфер, 1× краситель EvaGreen и 0,05 е.а./мкл реакционной смеси ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus*, и по 500 нМ прямого и обратного праймеров для референсного гена (актина, АСТВ) или гена-мишени.

Количественную ПЦР-РВ амплификацию проводили на термоциклере по следующей программе: первичная денатурация: t=95°C в течение 3 мин. 40 циклов: t=95°C в течение 10 с, t=60°C в течение 30 с, t=72°C в течение 30 с. В одной постановке в качестве матрицы использовали одновременно кДНК опытной (опухоль) и контрольной (условно здоровая ткань) пробы для определения сигналов, продуцируемых амплификатами локусов ESR1 и референсного АСТВ, каждого в трех повторностях.

Относительная экспрессия генетических локусов вычислялась следующим образом:

- рассчитывали медиану C_t по трем повторам для целевого локуса и референсного

АСТВ,

- далее рассчитывали величину $\Delta C_t = C_t(\text{ESR1}) - C_t(\text{АСТВ})$,

- относительную экспрессию генетического локуса (RE) рассчитывали по формуле $2^{-\Delta C_t}$.

Вывод об изменении экспрессии гена делали, сравнивая показатели относительной экспрессии генетических локусов в опухолевой и условно здоровой ткани. Для этого вычисляли медиану RE_{оп} опухолевых образцов и медиану RE_к контрольных (условно здоровая ткань) для каждого генетического локуса и рассчитывали соотношение относительной экспрессии генов в опухолевой ткани по отношению к нормальной

ткани матки: $K = RE_{\text{cancer}} / RE_{\text{normal}}$.

Далее сравнивают полученные значения K с интервалом прогностического коэффициента экспрессии, и при значении K в пределах $K_{\text{ESR1}} \leq 1$ прогнозируют течение заболевания без рецидива, а при значении $K_{\text{ESR1}} \geq 6$ прогнозируют течение заболевания с последующим рецидивом. При значениях коэффициента K между указанными интервалами считают полученный результат неопределенным.

Для доказательства прогностической ценности предлагаемой тест-системы приводятся 2 выписки из историй болезни.

Пример №1. Больная С. 61 года, госпитализирована в марте 2013 г. в онкогинекологическое отделение РНИОИ с верифицированным диагнозом рак тела матки после биопсии эндометрия по месту жительства. Морфологическое заключение о наличии эндометриоидной аденокарциномы было подтверждено при пересмотре в РНИОИ.

K_{ESR1} в биоптатах у данной пациентки составил 9,30.

На этапе догоспитального обследования при комбинированном сонографическом исследовании гениталий и органов брюшной полости, малого таза было обнаружено минимальное распространение процесса в пределах полости матки, без перехода на цервикальный канал. В зоне срединного М-эха обнаружили участки повышенной эхогенности с толщиной эндометрия до 5-6 мм. В тазовых и парааортальных лимфатических узлах при СРКТ признаков метастатического поражения не выявлено, что позволило предположить до операции стадию T1N×M0. Сопутствующее гинекологическое заболевание - мелкоузловая миома матки. Рак эндометрия у больной развился на фоне метаболического синдрома в менопаузе более 7 лет.

16.03.2013 г. больной было выполнено хирургическое вмешательство согласно стандарту лечения: нервосберегающая пангистерэктомия, тазовая и селективная парааортальная лимфаденэктомия. При макроскопической оценке в удаленной матке была обнаружена полиповидная экзофитная опухоль, распространяющаяся на всю

5 полость матки, исключая цервикальный канал.

Послеоперационное течение - без особенностей. Морфологический анализ после операции - в полости матки эндометриоидная аденокарцинома G2 с инвазией в миометрий на глубину 2 мм при толщине стенки матки 2,5 см; в удаленных лимфоузлах и по линии резекции влагалища признаков опухолевого роста не обнаружено. Таким

10 образом, степень распространения процесса, согласно классификации TNM соответствовала T1aN0M0.

Учитывая общую площадь поражения полости матки карциномой эндометрия и умеренную степень дифференцировки опухоли, в апреле-мае 2010 г. больная получила курс адъювантной сочетанно-лучевой терапии: ТА=40 Гр, ТВ=40 Гр и эндовагинальную

15 γ-терапию в дозе 40 Гр. В октябре 2013 г. при очередном диспансерном осмотре в культе влагалища у больной был обнаружен рецидив, подтвержденный цитологически (ц.а. №34721-23 аденокарцинома). В этой связи больной было проведено 6 курсов полихимиотерапии по схеме САР (циклофосфан-адриамицин-диплатин).

На фоне проведения последнего курса в марте 2014 г. в правой паховой области у

20 пациентки появился метастаз. Опухоль верифицирована: метастаз аденокарциномы. Больная консультирована в РОНЦ им. Н.Н. Блохина в апреле 2014 года, где во время обследования были обнаружены метастатические лимфоузлы в правой аксиллярной области, верифицированные при пункционной биопсии, как аденокарцинома. В апреле 2014 года начата II линия полихимиотерапии по схеме АUC-7, которую больная не

25 закончила из-за продолжающейся неконтролируемой генерализации с метастазами в легкие.

Смерть больной наступила в мае 2014 года, через 15 месяцев после стандартного радикального лечения.

* * *

30 Пример №2. Больная Б., 63 лет, госпитализирована в онкогинекологическое отделение РНИОИ 27 ноября 2013 г. с верифицированным и подтвержденным при пересмотре в РНИОИ диагнозом: рак тела матки в глубокой менопаузе, аденокарцинома.

На догоспитальном этапе при сонографическом комбинированном исследовании была обнаружена матка без признаков миомы, нормальных размеров, с неравномерно

35 утолщенным эндометрием до 6-8 мм, местами повышенной эхогенности в зоне срединного М-эха. При СРКТ признаков отдаленного метастазирования и поражения тазовых и парааортальных лимфоузлов не обнаружено.

Сопутствующая соматическая патология - гипертоническая болезнь, сахарный диабет II типа, избыточный вес - признаки метаболического синдрома. 30 ноября 2013 г.

40 больной выполнена стандартная операция: нервосберегающая пангистерэктомия, тазовая и селективная парааортальная лимфаденэктомия.

Макроскопически преимущественно в области дна и верхней половины полости матки обнаружена экзофитная опухоль с инфильтрацией в миометрий и очагами деструкции. Послеоперационный период - без осложнений. Морфологический анализ

45 - эндометриоидная аденокарцинома с инвазией 1/2 стенки матки.

K_{ESR1} в биоптате у данной пациентки составил 0,72.

В лимфатических узлах и по линии резекции влагалища признаков опухолевого роста не обнаружено, что позволило определить степень распространения процесса, как

T1bN0M0. Согласно стандарту комбинированного лечения больная получила курс адъювантной сочетано-лучевой терапии общей СОД: ТА=50 Гр, ТВ=40, FP и эндовагинально 40 Гр.

Больная наблюдается без признаков рецидива и метастазов.

5 С помощью предлагаемой тест-системы было осуществлено прогнозирование течения заболевания у 30 пациенток с диагностированным раком тела матки.

Технико-экономическая эффективность изобретения «Тест-система для прогнозирования развития рецидивов у больных раком тела матки на основании уровня экспрессии гена ESR1» заключается в возможности с высокой точностью прогнозировать
10 исход такого заболевания как рак тела матки. Заявляемая тест-система, включает разработанные нами праймеры и является экономически оправданной для уточнения особенностей течения заболевания и дает возможность скорректировать тактику лечения, осуществляется в условиях стандартной лаборатории молекулярной биологии (ПЦР), без использования специального дорогостоящего оборудования; обладает
15 высокой чувствительностью и специфичностью, осуществление анализа возможно с операционными биоптатами немедленно замороженными в жидком азоте и занимает не более 10 часов (с учетом подготовительных этапов), и не более 3,5 часов (при непосредственном использовании тест-системы).

20 (57) Формула изобретения

Тест-система для прогнозирования рецидивов у больных раком тела матки на основании уровня экспрессии гена ESR1, включающая реагенты для амплификации библиотеки кДНК, полученной на матрице тотальной РНК с помощью реакции обратной транскрипции в режиме реального времени - ПЦР-РВ и контрольные смеси,
25 отличающаяся тем, что используют смесь для ПЦР-РВ реакции: 1 мМ dNTPs, 12,5 мМ MgCl₂, 5-кратный ПЦР-буфер с 5-кратным красителем EvaGreen Dye, ДНК-полимеразу *Thermus aquaticus* 5 ед/мкл и высокоспецифичные праймеры для генов ESR1 и АСТВ, проводят две амплификации: контрольную и основную, анализируют первичные данные с помощью программного продукта амплификатора и рассчитывают относительную
30 экспрессию генетического локуса ESR1 по формуле $RE=2^{-\Delta C_t}$ с последующим вычислением соотношения относительной экспрессии этого гена в опухолевой ткани относительно нормальной ткани матки по формуле $K=RE_{cancer}/RE_{normal}$, где K - коэффициент относительной экспрессии, RE_{cancer} - относительная экспрессия в
35 опухолевой ткани, RE_{normal} - относительная экспрессия в условно нормальной ткани, сравнивают полученные значения K с интервалом прогностического коэффициента экспрессии и при значении $K_{ESR1} \leq 1$ прогнозируют течение заболевания без рецидивов, при значении $K_{ESR1} \geq 6$ развитие рецидивов, а при значениях коэффициента K между
40 указанными интервалами считают полученный результат неопределенным, при этом используют специфичные олигонуклеотидные праймеры для определения экспрессии гена ESR1: прямой TGGAGTCTGGCTCTGTGAGG, обратный CAATGGTGCACCTGGTTGGTG относительно гена АСТВ: прямой AACCGCGAGAAGATGACCC, обратный AGCACAGCCTGGATAGCAAC для
45 предложенной выше тест-системы, последовательности которых подобраны с учетом сплайсинга мРНК.