РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2740576

МАЛОИНВАЗИВНЫЙ СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛИ ПРЯМОЙ КИШКИ К ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ НА ОСНОВАНИИ ИЗМЕНЕНИЯ КОПИЙНОСТИ ГЕНОВ H2AX И RBBP8

Патентообладатель: ***федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)***

Авторы: ***см. на обороте***

Заявка № **2019135781**
Приоритет изобретения **06 ноября 2019 г.**
Дата государственной регистрации в
Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **15 января 2021 г.**
Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **06 ноября 2039 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 740 576**(13) **C1**

(51) МПК
G16B 20/10 (2019.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G16B 20/10 (2020.08); C12Q 1/686 (2020.08); C12Q 1/6886 (2020.08); C12Q 2545/114 (2020.08)

(21)(22) Заявка: **2019135781, 06.11.2019**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.11.2019

Дата регистрации:
15.01.2021

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **06.11.2019**

(45) Опубликовано: **15.01.2021** Бюл. № 2

Адрес для переписки:
344037, г. Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63, НМИЦ онкологии, Ишониной О.Г.

(72) Автор(ы):
Кутилин Денис Сергеевич (RU),
Кошелева Наталия Геннадьевна (RU),
Гусарева Марина Александровна (RU),
Полуэктов Сергей Игоревич (RU),
Легостаев Владислав Михайлович (RU),
Тимошкина Наталья Николаевна (RU),
Кит Олег Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 2010/144192 A1, 16.12.2010. КУТИЛИН Д.С. и др. "Особенности протеомного профиля в тканях больных колоректальным раком с метастазами и без метастазов." Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки, 2017, 4-2 (196-2), 84-95. NA JURI et al. "Monitoring radio-sensitizing effect of colon cancer cells on mouse** (см. прод.)

(54) МАЛОИНВАЗИВНЫЙ СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛИ ПРЯМОЙ КИШКИ К ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ НА ОСНОВАНИИ ИЗМЕНЕНИЯ КОПИЙНОСТИ ГЕНОВ H2AX И RBBP8

(57) Реферат:

Изобретение относится к молекулярной онкологии. Предложен малоинвазивный способ определения чувствительности опухоли прямой кишки к лучевой терапии на основании изменения копийности генов H2AX и RBBP8 относительно референсного гена GAPDH методом ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA-Green и высокоспецифичных праймеров. Способ обладает высокой чувствительностью и специфичностью, позволяет сделать процедуру диагностики более простой и точной, а также может позволить своевременно скорректировать тактику проводимой терапии. 1 табл.

RU 2740576 C1

RU 2740576 C1

(56) (продолжение):
tumor models by induced inefficient DSB repair." Journal of Nuclear Medicine, 2014, 55.supplement 1: 227-227. SORIA-BRETONES I. et al. "Prognostic value of Ct IP/RBBP8 expression in breast cancer." Cancer medicine, 2013, 2(6): 774-783. JI JIUPING et al. "Phosphorylated fraction of H2AX as a measurement for DNA damage in cancer cells and potential applications of a novel assay." PloS one, 2017, 12(2): e0171582. RU 2586775 C1, 10.06.2016. WO 2012/066451 A1, 24.05.2012.

RU 2740576 C1

RU 2740576 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 740 576**(13) **C1**

(51) Int. Cl.
G16B 20/10 (2019.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
G16B 20/10 (2020.08); C12Q 1/686 (2020.08); C12Q 1/6886 (2020.08); C12Q 2545/114 (2020.08)

(21)(22) Application: **2019135781, 06.11.2019**

(24) Effective date for property rights:
06.11.2019

Registration date:
15.01.2021

Priority:
(22) Date of filing: **06.11.2019**

(45) Date of publication: **15.01.2021** Bull. № **2**

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

(72) Inventor(s):
Kutilin Denis Sergeevich (RU),
Kosheleva Nataliya Gennadevna (RU),
Gusareva Marina Aleksandrovna (RU),
Poluektov Sergej Igorevich (RU),
Legostaev Vladislav Mikhajlovich (RU),
Timoshkina Natalya Nikolaevna (RU),
Kit Oleg Ivanovich (RU)

(73) Proprietor(s):
federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe uchrezhdenie "Natsionalnyj meditsinskij issledovatelskij tsentr onkologii" Ministerstva zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (RU)

(54) MINIMALLY INVASIVE METHOD FOR DETECTING SENSITIVITY OF RECTAL TUMOUR TO RADIATION THERAPY BASED ON CHANGE IN ABUNDANCE OF N2AX AND RBBP8 GENES

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to molecular oncology. Disclosed is a minimally invasive method for detecting rectal tumour sensitivity to radiation therapy based on variation of duplicity of H2AX genes and RBBP8 relative to the reference GAPDH gene by PCR-PB in the presence of EVA-Green dye and high-specific primers.

EFFECT: method has high sensitivity and specificity, enables making the diagnosis procedure more simple and accurate, and also enables timely correction of the therapeutic approach.

1 cl, 1 tbl

RU 2740576 C1

RU 2740576 C1

Изобретение относится к медицине, а именно к молекулярной биологии и онкологии, и может быть использовано для малоинвазивной диагностики радиорезистентных форм рака прямой кишки.

Колоректальный рак (КРР) - одно из наиболее распространенных злокачественных новообразований в мире: каждый год регистрируется около 1000000 новых случаев этого заболевания и более 700000 летальных исходов. В России за последнее 10 лет заболеваемость КРР значительно увеличилась, и как по числу новых случаев, так и по числу умерших больных уступает лишь раку легкого, желудка и молочной железы (Кутилин Д.С, Кошелева Н.Г., Максимов А.Ю., Гусарева М.А., Бондаренко Е.С., Сагакянц А.Б., Донцов В.А., Габричидзе П.Н., Черняк М.Н., Гречкин Ф.Н., Мезенцев С.С, Ульянова Е.П., Полуэктов СИ. Влияние различных доз лучевой терапии на выживаемость клеток аденокарциномы толстой кишки линии НТ-29 // Современные проблемы науки и образования. - 2019. - №3.; URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=28918 (дата обращения: 06.09.2019).).

Радиотерапия в интеграции с химиотерапией и хирургические методы являются основными направлениями лечения КРР (Кит О.И, Геворкян Ю.А., Солдаткина Н.В., Новикова И.А., Гусарева М.А. Клинико-морфологические эффекты предоперационной лучевой терапии крупным

фракционированием дозы при раке прямой кишки // Тюменский медицинский журнал. - 2016. - Т. 18. - №2. - С 39-44.). Один из вариантов предоперационного лечения - это короткий курс лучевой терапии, который проводится на первичную опухоль и зону регионарного метастазирования за 5 фракций с разовой очаговой дозой (РОД) 5 Гр до СОД (суммарной очаговой дозы) 25 Гр, что изоэффективно 40 Гр. (Кутилин Д.С, Кошелева Н.Г., Максимов А.Ю., Гусарева М.А., Бондаренко Е.С, Сагакянц А.Б., Донцов В.А., Габричидзе П.Н., Черняк М.Н., Гречкин Ф.Н., Мезенцев С.С, Ульянова Е.П., Полуэктов СИ. Влияние различных доз лучевой терапии на выживаемость клеток аденокарциномы толстой кишки линии НТ-29 // Современные проблемы науки и образования. - 2019. - №3.; URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id:=28918 (дата обращения: 06.09.2019).). Большое влияние на эффективность подобной терапии оказывает исходная радиорезистентность опухолевых клеток, зависящая от их генетических особенностей (Ярмоненко СП., Вайнсон А.А. Радиобиология человека и животных. М., 2004.549 с). К подобным особенностям можно отнести показатель копийности генов (Copy Number Variation (CNV)) - вид генетического полиморфизма, результатом которого может явиться снижение или повышение числа копий определенного гена, и, следовательно, пониженная или повышенная экспрессия продукта гена -белка или не кодирующей РНК (Кутилин Д.С, Айрапетова Т.Г., Анистратов П.А., Пыльцин СП., Лейман И.А., Карнаухов Н.С, Кит О.И. Изменение копийности генов в опухолевых клетках и внеклеточной ДНК у больных аденокарциномой легкого // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. -2019. - Т. 167. - №6. - С. 731-738; Zarrei M., MacDonald J.R., Merico D., Scherer S.W. A copy number variation map of the human genome// Nature Reviews Genetics. - 2015. - №16(3). - PP. 172-83.).

CNV являются следующим уровнем в полном понимании молекулярного контекста развития опухолевого процесса. Так была изучена роль CNV в качестве фактора малигнизации тканей желудка и легкого (см. Gunther T., Schneider-Stock R., Häckel C, Kasper H.U., Pross M., Hackelsberger

A., Lippert H., Roessner A. Mdm2 gene amplification in gastric cancer correlation with expression of Mdm2 protein and p53 alterations. A Mod Pathol. - 2000 - V. 13(6) - P.621-626; Кутилин Д.С, Енин Я.С, Петрусенко Н.А., Водолажский Д.И. Изменение копийности

генетических локусов при малигнизации тканей легкого // Современные проблемы науки и образования. - 2016. - №6.; URL: https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25994). Было проведено исследование относительной копийности генетических локусов, ответственных за регуляцию апоптоза (BAX, BCL2, C-FLAR, P53, MDM2), пролиферацию (SOX2, OCT4, NANOG, PIK3 и MKI67), окислительное фосфорилирование (HV2) и ответ на гипоксию (HIF1A1) в образцах, содержащих опухолевые и нормальные клетки тканей легкого и выявлены генетические локусы, которые имеют высокий потенциал в качестве молекулярных маркеров для прогнозирования рака легкого (HV2, HIF1A1, P53, MDM2). Однако этот потенциал ограничен высоким уровнем инвазивности при получении биоматериала. Возможное решение этой проблемы находится в переходе на исследование копийности генов во внеклеточной ДНК плазмы крови.

К внеклеточной ДНК в организме следует относить: клеточную и митохондриальную ДНК из соматических и из опухолевых клеток, подвергающихся процессам апоптоза и некроза; ДНК из эритробластов, ядра которых энуклеируются в процессе дифференцировки в эритроциты, ДНК из лимфоцитов в процессе их апоптотической гибели после стимуляции, ДНК эмбрионов в крови матери, бактериальную и вирусную ДНК. При многих видах опухолей определяется повышенный уровень внеклеточной ДНК (внДНК) в периферической крови. При этом прогресс заболевания часто связан с постепенным повышением уровня внДНК. Более того, довольно часто уровень внДНК возрастает при метастазировании опухоли, по сравнению со значениями в отсутствие последних (см. Козлов В.А. Свободная внеклеточная ДНК в норме и при патологии. Медицинская иммунология. 2013, Т. 15, №5, с. 399-412).

Изменение числа копий генов H2AX и RBBP8 ассоциировано с развитием радиорезистентности опухолевых клеток.

Ген H2AX кодирует гистоновый белок из семейства H2A. В ответ на двухцепочечные разрывы в ДНК, вызванные ионизирующим излучением, H2AX становится фосфорилированным по серину в положении 139 (H2AX). Из-за этой модификации (фосфорилированной формы гистона) ДНК становится менее конденсированной, освобождается место для присоединения белковых комплексов, необходимых во время репарации (см. Ayoub N., Jeyasekharan A.D., Bemal J.A., Venkitaraman A.R. HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response// Nature. - 2008. - V.453 (7195). - P. 682-6).

RBBP8 кодирует белок, который регулирует пролиферацию клеток. Этот белок образует комплексы с транскрипционным ко-репрессором CTBP, а также модулирует функции BRCA1 в регуляции транскрипции и репарации ДНК (см. Sartori A.A., Lukas C, Coates J., Mistrik M., Fu S., Bartek J., Baer R., Lukas J., Jackson S.P.Human CtIP promotes DNA end resection// Nature. - 2007. - V. 450(7169). - P. 509-14.).

Поэтому, в качестве маркеров для прогнозирования радирезистентности рака прямой кишки допустимо использование показателя относительной копийности H2AX и RBBP8.

Из патентных источников известно следующее изобретение, наиболее близкое нашему:

«Способ прогнозирования чувствительности опухоли к лучевой терапии у больных раком прямой кишки» (см. патент RU 2349916 C1, опубликован: 20.03.2009, Бюл. №8) Способ основан на гистологическом исследовании биоптата, взятого из опухоли после 4-го сеанса лучевой терапии, проводимой дробно-протяженным методом. При наличии патоморфоза III-IV степени прогнозируют высокую чувствительность опухоли к облучению, а при наличии патоморфоза I-II степени - низкую чувствительность. Использование способа позволяет прогнозировать чувствительность опухоли у больных раком прямой кишки к проводимой лучевой терапии в ранние сроки, что позволяет

при выявлении радиорезистентности опухоли своевременно выполнять радикальную операцию - экстирпацию прямой кишки.

Однако, описанный выше способ принципиально отличается от нашего. Данный способ не является малоинвазивным и не позволяет диагностировать радиорезистентную форму рака прямой кишки до начала терапии.

Анализ патентных источников (www.fips.ru) также показал отсутствие действующих патентов и заявок на «Малоинвазивный способ определения чувствительности опухоли прямой кишки к лучевой терапии на основании изменения копийности генов H2AX и RBBP8».

Техническим результатом заявляемого изобретения является создание нового, простого в исполнении, не дорогостоящего и точного способа с уникальными высокоспецифичными последовательностями синтетических олигонуклеотидов (праймеров) для диагностики радиорезистентного рака прямой кишки.

Сущность способа заключается в том, что образцы крови (10 мл крови и 3 мл 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,5, с 0,15 М NaCl и 50 мМ ЭДТА) разделяют на плазму и фракцию клеток центрифугированием в течение 20 минут при 400 g при 15°С. Из плазмы крови выделяют внДНК фенол-хлороформным методом и проводят амплификацию с высокоспецифичными праймерами для генов H2AX RBBP8 и GAPDH, анализируют первичные данные и вычисляют относительную копийность (rC) по формуле $2^{-}\Delta Ct$, где $\Delta Ct=Ct(H2AX \text{ или } RBBP8) - Ct(GAPDH)$. Затем сравнивают полученные значения rC с прогностическими значениями копийности, и при значениях в интервале $rC_{H2AX}>13,1*10^{-3}$ и $rC_{RBBP8}>21,8*10^{-3}$ у пациента диагностируют радиорезистентную форму рака прямой кишки (чувствительность 96%, специфичность 95%), а при значениях в интервале $rC_{H2AX}<13,1*10^{-3}$ и $rC_{RBBP8}<21,8*10^{-3}$ у пациента диагностируют чувствительную к лучевой терапии форму рака прямой кишки (чувствительность 96%, специфичность 92%).

Заявленный анализ основан на определении количества копий генов H2AX или RBBP8 относительно референсного гена GAPDH во внДНК плазмы крови больных раком прямой кишки, и последующем сравнении полученных значений с интервалом копийности rC_{H2AX} и rC_{RBBP8} характерным для радиорезистентной или чувствительной к лучевой терапии формы рака прямой кишки.

Заявленный способ включает следующие приемы:

- выделение внеклеточной ДНК из плазмы крови с помощью метода фенол-хлороформной экстракции;
- определение относительной копийности генетических локусов H2AX и RBBP8 методом ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA-Green и специфичных праймеров на матрице выделенной внДНК;
- анализ первичных данных с помощью программного продукта амплификатора;
- расчет относительной копийности гена (гС) на основании соотношения сигналов, продуцируемых амплификатами изучаемой и референсной последовательностей,
- сравнением гС пробы с прогностическими значениями копийности $rC_{стандарт}$, определенными для радиорезистентной и чувствительной к лучевой терапии формы рака прямой кишки.

Для осуществления способа были разработаны специфичные олигонуклеотидные прямые и обратные праймеры для генов Н2ЛХ, RBBP8 и GAPDH. Дизайн специфичных олигонуклеотидных праймеров (таблица 1) осуществлялся с использованием

референсных последовательностей NCBI GenBank.

Таблица 1

Праймеры для малоинвазивного способа определения чувствительности опухоли прямой кишки к лучевой терапии на основании изменения копийности генов *H2AX* и *RBBP8*

Наименование праймеров	Хромосомная локализация	Последовательность
H2AX_F H2AX_R	Chr 11: 119.09 – 119.1	AGGCCTCCCAGGAGTACTAA (SEQ ID NO 1) CTGAAGCGGCTCAGCTCTTT (SEQ ID NO 2)
RBBP8_F RBBP8_R	Chr 18: 22.8 – 23.03	ACCGAGGATTTGGCACTCTG (SEQ ID NO 3) TCCGAGATTGCCTCGGGATT (SEQ ID NO 4)
GAPDH_F GAPDH_R	Chr 12: 6.53 – 6.54	GCTGAACGGGAAGCTCACT (SEQ ID NO 5) GCAGGTTTTTCTAGACGGCAG (SEQ ID NO 6)

Заявленный способ осуществляется следующим образом:

На первом этапе образцы крови (10 мл крови и 3 мл 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,5, с 0,15 М NaCl и 50 мМ ЭДТА) разделяют на плазму и фракцию клеток центрифугированием в течение 20 минут при 400 g при 15°С.Из плазмы крови ДНК выделяют фенол-хлороформным методом в нашей модификации. К плазме крови добавляют равный объем лизирующего буфера (2% SDS и 1% меркаптоэтанол) и 20 мкл протеиназы К, инкубируют в термостате при 58°С 1 час.К полученному лизату добавляют равный объем щелочного фенола и хлороформа (соотношение 1:1), центрифугируют 20 минут 3000 об/мин. После разделения фаз отбирают водную фазу в отдельную стерильную пробирку. К водной фазе добавляют равный объем 95% изопропилового спирта и раствор 5М NaCl до концентрации 100 тМ, пробирку помещают в холодильник на -20°С на 60 минут. Далее центрифугируют 15 минут при 12700 об/мин, при -10°С, декантируют супернатант, а осадок промывают 80% этиловым спиртом, центрифугированием удаляют остатки этанола, высушивают осадок в твердотельном термостате и растворяют в 10 мМ ТЕ буфере. Концентрация полученных препаратов ДНК измеряется на флюориметре. Для проведения ПЦР-РВ концентрацию ДНК в каждом образце нормализуют до 0,5 нг/мкл.

Амплификацию проводят в 20 мкл ПЦР-смеси, содержащей 3 нг внДНК, 0,20 мМ dNTPs, 2,5 мМ $MgCl_2$, 1х ПЦР-буфер, 1х краситель EvaGreen, и 0,1 е.а./мкл реакционной смеси ДНК-полимеразы Thermus aquaticus, и по 600 нМ прямого и обратного праймеров для референсного гена или гена-мишени.

Количественную ПЦР-РВ амплификацию проводят на термоциклере по следующей программе: t=95°С в течение 4 мин. 40 циклов: t=95°С в течение 10 с, t=58°С (чтение сигнала) в течение 30 с, t=72°С в течение 30 с.

Относительная копийность генов H2AX и RBBP8 вычисляется следующим образом: рассчитывается C_t для целевого (H2AX или RBBP8) и референсного локуса (GAPDH), далее рассчитывается величина AQ -C_t(целевой локус) - C_t(референсный локус); копийность целевого локуса относительно референсного (rC) рассчитывается по формуле $2^{-}\Delta Ct$.

Сравниваются полученные значения rC с интервалом прогностического коэффициента копийности:

- при значениях $rC_{H2AX}>13,1*10^{-3}$ и $rC_{RBBP8}>21,8*10^{-3}$ у пациента диагностируют

радиорезистентную форму рака прямой кишки (чувствительность 96%, специфичность 95%),

- при значениях $rC_{H2AX}<13,1*10^{-3}$ и $rC_{RBBP8}<21,8*10^{-3}$ у пациента диагностируют чувствительную к лучевой терапии форму рака прямой кишки (чувствительность 96%, специфичность 92%).

Предлагаемым способом было осуществлено обследование 30 пациентов, у которых был диагностирован рак прямой кишки. Для доказательства прогностической ценности предлагаемого способа приводятся две выписки из историй болезни.

1. Больной Ш., 70 лет, состоит на учете в РНИОИ с июня 2019 г, диагноз рак средне- и верхнеампулярного отделов прямой кишки, $cT3N_0Mo$, St II, кл.гр.

МРТ ОБП, ОМТ (от 10.06.2019 г.) - на 12-14 см от анодермального перехода, в области границы средне- и верхнеампулярного отделов прямой кишки по левой стенке участок опухоли 16х24х11 мм. Лимфоузлы не поражены. СРКТ ОГК (от 13.06.2019 г.) - КТ-признаки единичных мелких очагов S1 справа и S3 слева. ВКС (от 01.07.2019 г.) - на 11 см до 15 см от ануса по левой стенке - опухолевидное экзофитное образование на широком основании в виде утолщенной фиксированной площадки с эрозированной мелкобугристой поверхностью. Гистологический анализ -G1 аденокарцинома.

Консультация радиолога (от 01.07.2019 г.) - показано проведение курса конформной лучевой терапии на зону прямой кишки, лимфоузлы малого таза, на фоне радиомодификации фторпиримидинами.

Перед началом лечения взята кровь для выделения внДНК. Результаты молекулярно-генетического анализа образцов внДНК $rC_{H2AX}=6,1*10^{-3}$ и $rC_{RBBP8}=12,0*10^{-3}$ соответствуют прогностическим коэффициентам чувствительной к лучевой терапии формы рака прямой кишки.

С 08.07.2019 г. по 07.08.2019 г. после СРКТ-топометрической подготовки проведен курс конформной лучевой терапии на зону прямой кишки, лимфоузлы малого таза на линейном ускорителе низких энергий Unique Varian 6MV, на фоне радиомодификации фторпиримидинами -капецитабин 1650 мг/м.

МРТ ОБП, ОМТ (от 30.09.2019 г.) - МР-признаков рецидива опухолевого процесса нет, метастатического поражения лимфатических узлов не обнаружено. ВКС (от 27.09.2019 г.) - эндоскопически полный регресс опухоли (полный патоморфоз).

2. Больной П., 70 лет, состоит на учете в РНИОИ с апреля 2019 г., диагноз: рак средне- и верхненеампулярного отделов прямой кишки, $cT3N1M_x$, St III, кл.гр.2.

ВКС (от 31.03.2019 г.) - на расстоянии 8 см от ануса до 18 см -слизистая бугристая, контактно кровоточива. Гистологический анализ -низкодифференцированная аденокарцинома. СРКТ ОГК, ОБП, ОМТ (от 10.04.2019 г.) - опухоль прямой кишки 9,1×4,6 см с переходом на ректосигмоидный отдел, инфильтрация окружающей клетчатки, мтс-узлами в ней до 1 см. МРТ ОБП, ОМТ (от 11.04.2019 г.) - на 8,6 см от входа в анус, на 4,5 см от анодермального перехода циркулярный опухолевый процесс, протяженностью не менее 80 мм. Структура опухоли преимущественно солидная, просвет локально сужен. Экстрамуральный рост с инвазией мезореткальной клетчатки, наличие десмопластической реакции клетчатки. В паректальной клетчатке лимфоузел 9 мм. В мезоректальной клетчатке -единичные лимфоузлы до 5-6 мм.

Консультация радиолога (от 16.04.2019 г.) покачано проведение курса конформной лучевой терапии на зону прямой кишки, лимфоузлы малого таза.

Перед началом лечения взята кровь для выделения внДНК. Результаты молекулярно-

генетического анализа образцов внДНК $rC_{H2AX}=16,5*10^{-3}$ и $rC_{RBBP8}=27,4*10^{-3}$ соответствуют прогностическим коэффициентам радиорезистентной формы рака прямой кишки.

С 23.04.2019 г. по 29.05.2019 г. после СРКТ-топометрической подготовки проведен курс конформной лучевой терапии на зону прямой кишки, лимфоузлы малого таза, паховые зоны с обеих сторон, на фоне радиомодификации капецитабином 1650 мг/м^2 в сутки на линейном ускорителе низких энергий Unique Varian 6MV.

МРТ ОБП, ОМТ (от 22.07.2019 г.) - МР-картина солидной опухоли средне- и верхненеампулярного отделов прямой кишки с инвазией окружающей клетчатки. ВКС (от 22.07.2019 г.) - рак прямой кишки, состояние после курса НАХЛТ, эндоскопически без выраженной динамики.

Заявляемый способ, включает разработанные нами праймеры и является экономически оправданным для диагностики радиорезистентного рака прямой кишки, осуществляется в условиях стандартной лаборатории молекулярной биологии (ПЦР), без использования специального дорогостоящего оборудования; обладает высокой чувствительностью и специфичностью, осуществление анализа возможно с плазмой крови, занимает не более 5 часов.

<110> Kutilin, Denis; Rostovskij nauchno-issledovatelskij onkologicheskij institut

<120> Low invasive method for radioresistant colon cancer diagnosis based on changes in the copy number of the H2AX and RBBP8 genes.

<160> 1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

AGGCCTCCCA GGAGTACTAA 20

<110> Kutilin, Denis; Rostovskij nauchno-issledovatelskij onkologicheskij institut

<120> Low invasive method for radioresistant colon cancer diagnosis based on changes in the copy number of the H2AX and RBBP8 genes.

<160> 2

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

CTGAAGCGGC TCAGCTCTTT 20

<110> Kutilin, Denis; Rostovskij nauchno-issledovatelskij onkologicheskij institut

<120> Low invasive method for radioresistant colon cancer diagnosis based on changes in the copy number of the H2AX and RBBP8 genes.

<160> 3

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ACCGAGGATT TGGCACTCTG 20

<110> Kutilin, Denis; Rostovskij nauchno-issledovatelskij onkologicheskij institut
<120> Low invasive method for radioresistant colon cancer diagnosis based on changes in the copy number of the H2AX and RBBP8 genes.
<160> 4
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 1
TCCGAGATTG CCTCGGGATT 20
<110> Kutilin, Denis; Rostovskij nauchno-issledovatelskij onkologicheskij institut
<120> Low invasive method for radioresistant colon cancer diagnosis based on changes in the copy number of the H2AX and RBBP8 genes.
<160> 5
<210> 1
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 1
GCTGAACGGG AAGCTCACT 19
<110> Kutilin, Denis; Rostovskij nauchno-issledovatelskij onkologicheskij institut
<120> Low invasive method for radioresistant colon cancer diagnosis based on changes in the copy number of the H2AX and RBBP8 genes.
<160> 6
<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 1
GCAGGTTTTT CTAGACGGCA G 21

(57) Формула изобретения

Малоинвазивный способ определения чувствительности опухоли прямой кишки к лучевой терапии на основании изменения копийности генов H2AX и RBBP8, включающий выделение внеклеточной ДНК из плазмы крови, отличающийся тем, что проводят определение копийности генов H2AX и RBBP8 относительно референсного гена GAPDH методом ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA-Green и высокоспецифичных праймеров: для H2AX SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, для RBBP8 SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, для GAPDH SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 на матрице выделенной внДНК, рассчитывают относительную копийность гена (rC) по формуле $rC=2^{\Delta Ct}$, где Ct - медиана сигналов флюоресценции, $\Delta C_t=C_t$(H2AX или RBBP8) C_t(GAPDH), и сравнивают полученные значения rC с прогностическим интервалом копийности, и при значениях $rC_{H2AX}>13,1*10^{-3}$ и $rC_{RBBP8}>21,8*10^{-3}$ у пациента диагностируют радиорезистентную форму рака прямой кишки, а при значениях $rC_{H2AX}<13,1*10^{-3}$ и $rC_{RBBP8}<21,8*10^{-3}$ у пациента диагностируют чувствительную к лучевой терапии форму рака прямой кишки.