

НАО «Западно-Казахстанский медицинский университет
имени Марата Оспанова»

АННОТАЦИЯ
НА СОИСКАНИЕ СТЕПЕНИ ДОКТОРА ФИЛОСОФИИ (PhD)

**«Эпидемиология, генотипирование рака молочной железы и оценка ответа
на химиотерапию методом мониторинга двухцепочечных разрывов ДНК
(γ -H2AX) в лимфоцитах»**

Специальность: 6D110100 – «Медицина»

АЙТМАГАМБЕТОВА МАРЖАН АЛТЫНБЕКОВНА

Научный консультант:

Руководитель кафедры
фармакологии Западно-Казахстанского
Медицинского Университета имени
Марата Оспанова
к.м.н., доцент **Смагулова Г.А.**

Научный консультант:

Председатель Правления ОИПиЮЛ
«Национальная Палата Здравоохранения»
д.м.н., профессор **Бекмухамбетов Е.Ж.**

Зарубежный консультант:

Вице Ректор по клинической работе,
Руководитель отделения онкологии
первой университетской клиники ТГМУ,
MD PhD **Ираклий Кохреидзе.**

Республика Казахстан
Актобе, 2023

АННОЦИЯ

Диссертации Айтмагамбетовой Маржан Алтынбековны на тему: «Эпидемиология, генотипирование рака молочной железы и оценка ответа на химиотерапию методом мониторинга двухцепочечных разрывов ДНК (γ -H2AX) в лимфоцитах» предоставленной на соискание степени доктора философии (PhD), по специальности 6D110100 – «Медицина»

Научный консультант: к.м.н., доцент Смагулова Г.А.

Научный консультант: д.м.н., профессор Бекмухамбетов Е.Ж.

Зарубежный консультант: д.м.н., профессор Ираклий Кохреидзе

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) одно из наиболее распространенных злокачественных заболеваний у женщин во всем мире, и основная причина смерти от рака [Ginsburg O., et al. 2017]. При сравнении данных GLOBOCAN 2018 и GLOBOCAN 2020 было отмечено увеличение заболеваемости и смертности от РМЖ, так в 2020 году во всем мире было зарегистрировано 19,1 миллиона новых случаев и 9,9 миллиона случаев смерти от РМЖ [<https://gco.iarc.fr>]. При этом стандартизированные показатели в мире по заболеваемости и смертности от рака молочной железы в 2020 году составили 47,8 и 13,6 случаев на 100000 населения [<https://gco.iarc.fr>]. По данным IARC Breast Source: Globocan 2020 в Республике Казахстан было диагностировано 35 366 новых случаев злокачественных новообразований, из них 4 390 (12,4%) случаев РМЖ. Смертность от всех злокачественных новообразований составляет 20 959 тыс., от рака молочной железы 1 654 тыс. (7,9%) [<https://gco.iarc.fr>]. По данным Аналитического обзора «О состоянии онкологической службы Актюбинской области за 2022год» по структуре заболеваемости рак молочной железы стоит на первом месте – 12,6%.

Согласно Глобальной программе CONCORD эпидемиологического надзора по выживаемости больных РМЖ, пятилетняя выживаемость составила примерно 90% в США и Австралии и 40% в Южной Африке. В Азии высокая пятилетняя выживаемость наблюдалась в Израиле (88%) и Японии (85%), а самая низкая - в Индии (66,1%) [Allemani C., et al. 2018].

Медико-генетическое консультирование с дальнейшим генетическим тестированием проводится для выявления наследственной предрасположенности к РМЖ, которое необходимо для верификации генетического диагноза в группах риска с последующей индивидуализацией диагностики, персонализированного подхода к лечению, прогноза и профилактики. Рак молочной железы представляет собой сложное заболевание, определяемое как генетическими, так и негенетическими факторами и, в большинстве случаев, без четкого наследования [Roberts E., et al. 2023]. Известно, что 40% злокачественных опухолей с различной анатомической локализацией имеют наследственную этиологию, но для РМЖ эта доля составляет 10%. К генам, ассоциированным с РМЖ, относятся BRCA1, BRCA2, CHEK2, NBS1, p53,

АТМ и др. Выявленные наследственные мутации увеличивают риск развития онкозаболевания [Лаптиев С.А., соавт. 2018]. Согласно эпидемиологическим исследованиям, только 15% - 20% семейного рака молочной железы в значительной степени предполагают мутации BRCA1 и BRCA2, тогда как остальные 80% - 85% семейного риска связаны с другими известными и неизвестными полиморфизмами генов [De Silva S., et al. 2019].

Работ, посвященных выявлению ассоциаций однонуклеотидных полиморфизмов и мутаций в других (не BRCA1 и не BRCA2) генах с риском развития РМЖ в казахской популяции в Западном Казахстане не проводилось, и подобные исследования определённо представляют научно-практический интерес. В Республике Казахстан не выработано единого чёткого алгоритма проведения молекулярно-генетической диагностики. Изучение молекулярно-генетических маркёров, ассоциированных с риском развития РМЖ в казахской популяции, позволит определить наследственную предрасположенность и проводить раннюю первичную и вторичную профилактику.

Текущие исследования биомаркеров рака в основном сосредоточены на опухолеспецифических антигенах. Недавние обзоры предлагают использовать маркеры клеточной пролиферации, онкоген-индуцированного старения, теломеразы, репарации повреждений ДНК и соответствующих эпигенетических маркеров в качестве общих биомаркеров рака, которые являются мощными и многообещающими для предсказания рака, прогноза, терапии и, возможно, профилактики рака [Shakyawar SK., et al. 2023]. Эффективность химиотерапии преимущественно основывается на разрушении быстро делящихся раковых клеток путем индукции различных видов повреждения ДНК. Наиболее опасным типом повреждении ДНК являются двухцепочечные разрывы ДНК. Повреждения ДНК, вызванные множеством причин, такими как ионизирующее излучение, гипоксия, активные формы кислорода (АФК) и некоторые химические вещества, а также ошибки репликации или транскрипции, активируют процессы репарации ее повреждений [Penninckx S., et al. 2021]. Одним из первых событий при активации путем репарации повреждений ДНК является фосфорилирование гистона H2AX по серину 139 на каждой стороне разрыва с образованием фокусов γ -H2AX [Porcedda P., et al. 2009]. Анализ очагов фосфорилированного гистоновый белок H2AX (γ H2AX) в настоящее время является наиболее чувствительным методом обнаружения двухцепочечных разрывов ДНК (ДЦР). Иммунофлуоресцентное окрашивание с антителом анти- γ H2AX обеспечивает визуализацию найденных ядерных очагов и коррелирует с количеством ДЦР [Raavi V., et al. 2020]. Фосфорилированный гистоновый белок γ -H2AX является специфичным биомаркером клеточного стресса, особенно при диагностике и мониторинге неопластических заболеваний.

Флуоресцентное микроскопическое исследование используется для быстрого и стандартизированного определения γ -H2AX и обеспечения срочной

оценки повреждений ДНК в клинической практике. Платформа, названная AKLIDES (Medipan, Далевиц, Германия), позволяет полностью автоматизировать оценку скрининга антинуклеарных иммунофлуоресцентных антител [Bizzaro N., et al. 2018], а также проводить вычислительный анализ очагов γ -H2AX, который в настоящее время успешно подтвержден несколькими независимыми исследовательскими группами [Willitzki A., et al. 2013]. Это делает обнаружение γ -H2AX привлекательным биомаркером, который может служить ранним индикатором рака.

Исходя из вышесказанного были сформулированы цели и задачи исследования.

Цель исследования

Изучение эпидемиологии рака молочной железы, полиморфизма генов, ассоциированных с раком молочной железы, и определение ценности мониторинга очагов γ -H2AX как возможного биомаркера ответа на химиотерапию.

Задачи исследования

1. Провести анализ заболеваемости рака молочной железы в Актюбинской области за 2014-2018гг. и 2022г.
2. Исследовать полиморфизмы генов BRCA 1, BRCA 2 у больных раком молочной железы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и определить однонуклеотидные полиморфизмы генов, ассоциированных с риском развития рака молочной железы, методом Next generation sequencing (NGS) секвенирования с биоинформационным анализом.
3. Провести пилотное исследование оценки ответа на химиотерапию у больных раком молочной железы путем мониторинга двухцепочечных разрывов ДНК в лимфоцитах (γ -H2AX).

Научная новизна

1. Проведен ретроспективный эпидемиологический анализ за 5 лет (2014-2018гг. и 2022г.) с использованием анализа динамики заболеваемости и выживаемости.
2. Впервые проведен генетический анализ мутации генов BRCA1 (мутации 185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 300T>G (Cys61Gly), 2080delA), BRCA2 (мутация 6174delT) методом ПЦР и секвенирование 113 кандидатных генов с использованием технологии NGS секвенирования (Next generation sequencing, Illumina), молекулярно-генетическое генотипирование с применением технологии чип-систем, биоинформационный анализ у казашек с РМЖ в Актюбинской области.
3. Проведено пилотное исследование очагов γ -H2AX как биомаркера ответа на химиотерапию РМЖ путем мониторинга двухцепочечных разрывов ДНК в лимфоцитах с помощью системы Aklides (MEDIPAN, Германия),

состоящей из флюоресцентного анализатора и программного обеспечения AKLIDES Nuk.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Результаты эпидемиологического анализа расширяют представления по динамике заболеваемости, 5-летней выживаемости РМЖ в Актюбинской области.

Результаты проведенного генетического тестирования у женщин казашек Актюбинской области позволяют идентифицировать предрасположенность к наследственным формам рака и направлять усилия на профилактику и раннюю диагностику онкологических заболеваний. Рекомендуются включить в скрининговую программу по выявлению РМЖ в группе риска (наследственный анамнез, молодой возраст, множественный рак) в Актюбинской области определение полиморфизмов генов: Rs137852985 (BRIP1), Rs2229774 (RARG), Rs2981582 (FGFR2), Rs889312 (MAP3K1).

Внедрение мониторинга анализа очагов γ -H2AX (focilint mean- среднее значение интенсивности для всех очагов) у больных раком молочной железы является частью персонифицированного подхода в отделении химиотерапии Медицинского Центра ЗКМУ им. М. Оспанова.

Положения, выносимые на защиту

1. Анализ динамики заболеваемости впервые выявленных случаев и общей заболеваемости РМЖ показал рост заболеваемости $R^2=0,3955$ ($p<0,021$) и $R^2=0,9188$ ($p<0,001$) соответственно. Прогнозируемое количество впервые выявленных случаев РМЖ в 2025 году составит 218 случаев. Прогнозируемая общая заболеваемость в 2025 году вырастет до 1766 заболевших.

2. В Актюбинской области полиморфизм гена BRCA1 (5382insC) выявлен в 0,72% и 300T>G (Cys61Gly) в 0,36% женщин с раком молочной железы по методу ПЦР.

- Выявлены 7 рисковых статистически значимых полиморфизмов, входящих в каталог GWAS и ассоциированных с риском развития РМЖ: RARG (Rs2229774), FGFR2 (Rs2981582), ATM (Rs1800057), MAP3K1 (Rs889312), BRCA2 (Rs11571833), FGFR2 (Rs7895676), FGFR2 (Rs1219648).

- Выявлена высокая генотипическая связь (генотип-фенотип) между 5 однонуклеотидными полиморфизмами и риском развития РМЖ по пяти генетическим моделям: rs2981582 гена FGFR2, rs2229774 гена RARG, rs889312 гена MAP3K1, rs137852985 гена BRIP1, rs137852576 гена AR.

- Определены ТОП – 32 прогностических фактора риска развития РМЖ с повышением уровней рисков от 69,7% до 90,6%, из которых наиболее важными являются: «Rs137852985 (BRIP1)», «Rs2229774 (RARG)» и «Rs2981582 (FGFR2)».

- Создана прогностическая модель риска развития РМЖ с высоким уровнем качества модели (0,88) и оценкой риска 95% при сочетании полиморфизмов,

входящих в каталог GWAS: «Rs2229774 (RARG)», «Rs889312 (MAP3K1)» и показателя «Возраст, лет <54,0».

3. Выявлены статистически значимые изменения показателей по каналам разрывов FITC и репарации APC очагов γ H2AX в лимфоцитах у женщин с раком молочной железы и доброкачественными заболеваниями, что позволяет использовать очаги γ H2AX в качестве диагностического маркера для выявления рака молочной железы. Выявленные статистически значимые изменения показателей по каналам разрывов FITC и репарации APC очагов γ H2AX в лимфоцитах у женщин с раком молочной железы и доброкачественными заболеваниями позволяют использовать очаги γ H2AX в качестве диагностического маркера для выявления рака молочной железы. Прогностическая модель оценки анализа очагов γ -H2AX в качестве маркера диагностики РМЖ показала «хорошее» и «среднее» качество прогноза для показателя «Среднее значение интенсивности для всех очагов» по каналам разрывов FITC (0,70) и репарации APC (0,69).

- Статистически значимые результаты позволяют использовать анализ очагов γ -H2AX в лимфоцитах пациенток рака молочной железы в качестве возможного раннего индикатора оценки эффективности химиотерапии.

Апробация результатов исследования состоялась:

Основные положения диссертации доложены на заседании научно-проблемной комиссии ЗКМУ им.М.Оспанова. Результаты проведенного исследования доложены на:

- VI международной научной конференция молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации», 7-8 декабря 2018г. Шымкент, Казахстан.
- VIII Ежегодной Международной Научно-Практической Конференции «Актуальные вопросы медицины» и «Спутниковый форум по общественному здоровью и политике здравоохранения», 10-12 апреля 2019 г. Баку, Азербайджан.
- «III Международной научно-образовательной конференции «Интернационализация непрерывного медицинского образования. Взгляд в будущее». 25-26 апреля 2019г. г. Актобе.
- VII Съезда онкологов и радиологов Казахстана с международным участием. Г.Нур-Султан. Октябрь, 2019.
- 12 Breast – Gynecological & Immunooncology International Cancer Conference 9-10 January 2020 Cairo, Egypt.

Публикации по теме диссертации:

По теме диссертации опубликовано 11 научных печатных работ, из них 3 статьи – в издании Scopus – Reports of practical oncology and radiotherapy (процентиль по Cite Score 32й, SJR 0,337 в 2021г); Carcinogenesis: Integrative Cancer Research (процентиль по Cite Score 72, SJR 1,178 в 2022г. Q1- Cancer Research, WoS IF-5,356 Q2); European review for medical and pharmacological sciences radiotherapy

(процентиль по Cite Score 78й, SJR 0,634 в 2022г); 2 статьи – в изданиях, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки РК; 6 – тезиса в сборниках международной конференции (в том числе зарубежных - 3 и индексируемых на базе Scopus – 2, на базе Web of Science – 1).

Диссертационное исследование проведено в рамках финансируемых научных проектов:

1. «Сравнительная экспериментально-клиническая оценка и методы коррекции осложнений, вызванных химиотерапией неопластических процессов молочных желез, ассоциированных с мутациями генов BRCA1, BRCA2 (экспериментально-клиническое исследование)» (Номер госрегистрации №: 0118PK01065, руководитель – Жексенова А.Н., ЗКМУ им.М.Оспанова). МОН РК, 2018-2020гг.
2. «Новые молекулярно-генетические способы досимптомной диагностики и методы лечения ряда значимых заболеваний» (Номер госрегистрации 0117PK00036, руководитель - Рамазанова Б. А., КазНМУ им. Асфендиярова). МОН РК, 2019г.
3. Внутривузовский грант НТП «Роль микроэлементного статуса, повреждений ДНК в развитии онкопатологии (на примере Актюбинской области)» руководитель - Батырова Г.А., ЗКМУ им.М.Оспанова 2020г.

Внедрения результатов исследования:

1. Результаты исследования внедрены в учебную программу интернатуры на кафедре Онкологии по специальности: «Общая медицина» по дисциплине «Онкология в ОВП» для 6 курса и «Введение онкологических больных в ПМСП» для 7 курса ЗКМУ имени Марата Оспанова. Основные положения диссертационной работы используются в лекционном материале и при проведении практических занятия (приложение Г)
2. Интеллектуальная собственность – 2 авторских свидетельств (приложение Д)

Личный вклад автора

Разработка цели и задач научного исследования, сбор и согласование данных клинических, лабораторных, молекулярных исследований, статистическая обработка результатов исследований, формулирование выводов и практических рекомендации.

Объем и структура диссертации: Диссертация изложена на 141 страницах компьютерного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы, приложения.

Библиография включает 248 источников, в том числе 241 зарубежных и 7 отечественных источника научной литературы. Докторская диссертация

иллюстрирована 19 таблицами и 30 рисунками, которые отражают суть проведенной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая характеристика работы

Данная работа проведена в МЦ ЗКМУ имени М.Оспанова и выполнена в рамках финансируемых проектов.

В соответствии с целями и задачами диссертационной работы разработан дизайн исследования, определяющий выбор материалов и методов исследования. Научно-исследовательская работа одобрена Биоэтической комиссией Западно-Казахстанского медицинского университета имени Марата Оспанова (протокол № 24 от 03.10.2017г.). Перед включением в исследование и после разъяснения процедур каждым участником подписывалось письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии включения: Все пациентки с раком молочной железы - I, II, IIIa, IIIb стадией, имеющие показания к оперативному лечению и химиотерапии.

Возраст старше 18 лет. В рамках задачи 2 (Этап Б) для проведения секвенирования и биоинформационного анализа было исследовано 149 этнических казашек. Пациентки с доброкачественным образованием молочной железы, подтвержденным гистологическим исследованием.

Критерии исключения: Беременные женщины. Пациенты 4 клинической группы с тяжелой сопутствующей патологией, отказ пациента.

1 задача: Эпидемиология рака молочной железы в Актюбинской области в 2014-2018гг. и 2020г. Был проведен ретроспективный эпидемиологический анализ за 5 лет (2014-2018гг. и 2022г.) с использованием анализа заболеваемости. Для выполнения данной задачи информация извлечена из Электронного регистра онкологических больных (ЭРОБ): (выгрузка 30 – формы, 7 – форма). Данные о численности населения Актюбинской области для расчета заболеваемости от рака молочной железы были получены из Актюбинского регионального статистического управления (2014-2018гг. и 2022г.).

2 задача. Этап А: Определение стандартной диагностической панели полиморфизмов мутации генов BRCA 1, BRCA 2 у больных раком молочной железы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Дизайн исследования – одномоментное поперечное исследование. Проведено генотипирование 278 пациенток в МЦ ЗКМУ имени Марата Оспанова с установленным диагнозом раком молочной железы с использованием стандартной диагностической панели из 8 полиморфизмов. Период исследования составил 2 года (2018-2019гг.). Определение аллельных вариантов генов BRCA 1 (мутации 185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 300T>G (Cys61Gly), 2080delA), BRCA 2 (мутация 6174delT) проведено с помощью набора реагентов «Онкогенетика» в ДНК человека, полученных из периферической крови, и аллельных вариантов

генов, ассоциированных с риском развития онкопатологии, методом (ПЦР) в режиме реального времени (Проба ГС-Генетика. ОнкоГенетика BRCA). Исследование проводилось в научной молекулярно-генетической лаборатории на базе НПЦ ЗКМУ имени Марата Оспанова. Получено одобрение локальной комиссией по биоэтике (номер одобрения: № 20 от 11.09.2017). Письменное информированное согласие было взято от всех субъектов исследования.

2 задача. Этап Б: Next generation sequencing (NGS) секвенирование и проведение биоинформационного анализа генов у больных раком молочной железы. Дизайн исследования – случай контроль. Секвенирование кандидатных генов с использованием технологии NGS секвенирования (Next generation sequencing, Illumina) и Молекулярно-генетическое генотипирование с применением технологии чип-систем – производилось на базе лаборатории Национального Центра биотехнологий КН МОН РК, г. Астана;

- Биоинформационный анализ - производился в медицинском университете Караганды, директором Научно-исследовательского Центра Ph.D. Бабенко Д.Б.

Генотипирование биоматериала (NGS секвенирование) проводилось с использованием панели из 113 однонуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с прогнозом и течением рака молочной железы в казахской этнической популяции. Проведено формирование групп пациенток в соответствии с критериями включения для забора биологического материала: 149 пациенток казахской популяции с морфологически подтвержденным раком молочной железы и 150 женщин контрольной группы. Осуществлен забор биологического материала (периферическая венозная кровь) у пациенток и лиц контрольной группы (условно здоровых женщин, не имеющие онкологического заболевания в анамнезе). Проведено выделение ДНК из биологического материала и лабораторный анализ на наличие однонуклеотидных полиморфизмов генов в биологических образцах.

3 задача. Анализ очагов γ -H2AX как биомаркера ответа злокачественного процесса на химиотерапию у больных с раком молочной железы путем мониторинга двухцепочечных разрывов ДНК в лимфоцитах на платформе «АКЛИДЕС». Дизайн исследования – проспективное когортное исследование. Исследование проведено на двух группах пациенток. Основная группа - 29 пациенток с первично верифицированным диагнозом РМЖ (средний возраст 56 (95%ДИ:51,4-60,76). Контрольная группа - 24 пациентки (средний возраст 43(95%ДИ:38,81-47,35) с гистологически верифицированным доброкачественным образованием МЖ. Исследование проводилось на базе МЦ и НПЦ ЗКМУ имени Марата Оспанова. Материал исследования - периферическая венозная кровь в объеме 10 мл (пробирка ЭДТА), содержащиеся мононуклеарные клетки. Анализ очагов γ -H2AX в лимфоцитах проводили с использованием набора для иммунофлуоресцентного окрашивания γ -H2AX (AKLIDES Nuk Human Lymphocyte Complete, Medipan).

Проект был одобрен локальной комиссией по биоэтике (протокол №57, 17.01.2020г.). Письменное информированное согласие было получено от всех субъектов исследования.

В доступной нам литературе не найдены рекомендации по проведению исследования разрывов ДНК как маркера эффективности химиотерапии при онкозаболеваниях молочной железы. Предложенная методика представляет собой пилотный проект, разработанный по предложению разработчиков платформы Аклидес из Германии. Учитывая технические сложности по реализации (проведение анализа в течение 1 часа после забора крови, участие в исследовании как стационарных и как амбулаторных пациенток) была предложена 4-х этапная схема проведения исследования в основной группе:

Исследование проведено в следующие сроки:

- до начала 1-го курса ХТ – 1 этап
- после проведения 1-го курса ХТ – 2 этап
- перед началом 2-го курса ХТ – 3 этап
- перед началом 3-го курса ХТ – 4 этап

В контрольной группе анализ проводился у женщин с верифицированным доброкачественным образованием молочной железы.

Пациенткам основной группы была проведена радикальная мастэктомия по Летягину, полихимиотерапия и лучевая терапия на аппарате TruBeam.

Методы статистической обработки данных

Задача 1: Статистический анализ включал вычисление частот и процентов в исследуемых переменных в соответствии с нормальностью распределения. Были рассчитаны доверительные интервалы ДИ 95%. Общая выживаемость оценивалась по методу Каплана-Мейера. Значения $p < 0.05$ считались статистически значимым. Тренды заболеваемости определены методом наименьших квадратов. Среднегодовой темп прироста (Тпр), процентные изменения оценивались методом линейного регрессионного анализа, включая прогностический индекс на 2025 год.

Задача 2, Этап А: Все показатели были рассчитаны 95% ДИ для компиляции данных, поскольку описательное исследование, применялись методы описательной статистики SPSS.

Задача 2, Этап Б: Статистическая обработка результатов исследования (биоинформационный анализ) включала в себя расчет равновесия Харди – Вайнберга, анализ ассоциаций на основе обобщенных линейных моделей, анализ ассоциаций между полиморфизмами и фенотипом доминантной генетической модели наследования. В целом, генотип-фенотип ассоциация оценивалась с использованием 5 различных моделей наследования: доминантная, кодоминантная, рецессивная, сверхдоминантная и логарифмическая модель наследования. Для выявления аллелей, статистически значимо связанных с течением РМЖ в казахской популяции (связи фенотип-генотип в группе РМЖ

при использовании доминантной модели наследования) была использована логистическая регрессия с применением поправки Бонферрони для значений p при множественном сравнении.

Задача 3: Для описания числовых шкал использовались среднее значение и стандартное отклонение в виде « $M \pm S$ ». На всех графиках для числовых переменных среднее арифметическое обозначено точкой, медиана обозначена горизонтальным отрезком, межквартильный размах представлен прямоугольником, минимальные и максимальные уровни представлены вертикальными отрезками. Сравнения двух групп по числовым переменным проводились с помощью непараметрического метода Манна-Уитни. Статистическая значимость различий групп для бинарных и категориальных показателей определялась с использованием метода Хи-квадрат Пирсона. Анализ динамики переменных в случае сравнения двух периодов осуществлялся на основе непараметрического метода Уилкоксона, в случае сопоставления трех и более измерений – при помощи непараметрического критерия Фридмана. Уровень статистической значимости был зафиксирован на уровне 0,05. Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью пакетов прикладных программ Statistica 10 и SAS JMP 11.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эпидемиология рака молочной железы в 2014-2018 гг. и 2022 г. в Актыобинской области. При анализе ЭРОБ в период с 2014 по 2018 гг. зарегистрирован 891 новый случай РМЖ в Актыобинской области. В 2022 году зарегистрировано 192 новых случаев РМЖ. Пятилетняя выживаемость за период исследования составила 51,6% (95%ДИ: 50,45-52,89). В 2022 г. 5-летняя выживаемость составила 55,09%. Смертность от РМЖ в 2022 году по данным ЭРОБ составила 41 случаев.

Анализ динамики впервые выявленных случаев РМЖ показал рост заболеваемости ($p < 0,021$). Наиболее высокие цифры отмечены в 2019 году (247 случаев), что, возможно, объясняется эффективным выполнением Программы Развития здравоохранения Республики Казахстан «Денсаулык» 2016-2019 годы. Последующий спад показателей в 2020 г. (155 случаев), по-видимому, связан с пандемией COVID-19, когда не проводились скрининговые программы по выявлению онкозаболеваемости. Прогнозируемый рост заболеваемости на 2025 год составит 218 случаев. Темп прироста составляет 1,6%. Анализ динамики общей заболеваемости РМЖ показал рост заболеваемости ($p < 0,001$). Наиболее высокая степень отмечается в 2021 году 1561, прогнозируется рост заболеваемости на 2025 год до 1766 заболевших.

Распространенность полиморфизмов генов BRCA 1, BRCA 2 у больных с раком молочной железы. Из обследованных 278 женщин семейный анамнез рака молочной железы был установлен в 33 (11,8%) случаях. Методом полимеразной цепной реакции выявлено 3 случая мутации гена BRCA 1 из 278

больных. У двоих пациенток наследственный анамнез отягощен, обнаружена мутация гена BRCA 1 полиморфизм 5382insC, у третьей пациентки наследственный анамнез не отягощен, но обнаружена мутация гена BRCA 1 полиморфизм 300T>G (Cys61Gly).

Результаты NGS секвенирования и биоинформационного анализа генов у больных с раком молочной железы. Этап Б: В исследование было включено 149 пациенток с верифицированным диагнозом рака молочной железы, поступивших в МЦ ЗКМУ имени Марата Оспанова в период 2018г. Контрольную группу составили 150 условно здоровых женщин, набранных в исследование в рамках проекта МОН РК. Все испытуемые были неродственными казашками по родословной. Панель генотипирования включала 113 полиморфизмов, локализованных в различных участках различных хромосом, а также в различных функциональных участках генов и межгенных участков по данным GWAS исследования.

При проведении сравнительной оценки различий аллелей и генотипов у больных РМЖ и контрольной группы выявили 28 статистически значимых полиморфизмов, ассоциированных с раком молочной железы. При анализе выявленных полиморфизмов, имеющих статистически значимые различия в исследуемых группах по каталогу GWAS (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>), были определены полиморфизмы, которые ассоциировались с риском развития РМЖ. GWAS каталог позволил определить 7 рисковых статистически значимых полиморфизмов: RARG (Rs2229774), FGFR2 (Rs2981582), ATM (Rs1800057), MAP3K1 (Rs889312), BRCA2 (Rs11571833), FGFR2 (Rs7895676), FGFR2 (Rs1219648).

Была определена генотипическая связь (генотип-фенотип) между 28 (SNP) однонуклеотидными полиморфизмами и риском развития РМЖ по пяти генетическим моделям (кододоминантная, доминантная, рецессивная, сверхдоминантная и лог-аддитивная модели). В результате анализа выявлено, полиморфизм rs2981582 гена FGFR2 увеличивает шансы развития РМЖ по 4 моделям наследования. Полиморфизм rs2229774 гена RARG увеличивает шансы развития РМЖ по 3 моделям наследования.

Полиморфизм rs889312 гена MAP3K1 повышает шансы развития РМЖ по 2 моделям наследования. Полиморфизм rs137852985 гена BRIP1 увеличивает шансы развития РМЖ по 4 моделям наследования. Генотип A/G rs137852576 AR гена повышает шансы развития РМЖ в 2.24 раз (кододоминантная модель).

Результаты однофакторного анализа рисков целевого показателя «РМЖ» показали, что 32 фактора имеют статистически значимое влияние на целевую переменную «РМЖ» с диапазоном уровней рисков от 50,7% до 90,6%. Под воздействием влияния факторов из списка ТОП-40, риски развития «РМЖ» увеличиваются от 47,6% до 100,0%. Лидирующими статистически значимыми факторами с повышением уровней рисков от 69,7% до 90,6% являются

полиморфизмы: «Rs137852985 (TC, TT)», «Rs2229774 (AG, AA)» и «Rs2981582 (AG, AA)». Замыкают список Топ-40 статистически значимые факторы «Rs1219648 (GG)», «Rs1800470 (TT, CC)» и «Rs12762549 (CG, GG)», которые повышают уровень риска от 53,0% до 63,0%.

По результатам метода дерева решений для целевого показателя «РМЖ» было выделено 6 рискованных классов с уровнями риска от 0,0% до 100,0% с помощью следующих пяти влияющих факторов: «Rs137852985», «Rs757229», «Rs2981582 и «Возраст, лет < 56,0», «Возраст, лет ≥ 49,0». При этом, высоко рискованный класс с уровнем риска 100,0% определяется на основе комбинации факторов «Rs137852985 (TC, TT)» и «Rs2981582 (AA, GG)». Прогнозное качество построенной модели имеет высокий уровень.

По результатам метода дерева решений для целевого показателя «РМЖ» (по данным GWAS каталога) было выделено 6 рискованных классов с уровнями риска от 1,9% до 95,8% с помощью следующих пяти влияющих факторов: «Возраст, лет», «Rs2229774», «Rs2981582», «Rs889312» и «Rs1800057». Высоко рискованный класс с уровнем риска 95,8% определяется на основе комбинации факторов «Возраст, лет < 54,0», «Rs2229774 (AG)» и «Rs889312 (AA, CC)». Прогнозное качество построенной модели имеет высокий уровень.

Результаты анализа очагов γ -H2AX ДНР ДНК как биомаркера ответа злокачественного процесса на химиотерапию РМЖ. Исследование проведено на больных раком молочной железы (основная группа) и женщинах с доброкачественными заболеваниями МЖ (контрольная группа) на платформе AKLIDES. В основную группу вошло 29 пациенток с РМЖ, средний возраст составил $56,10 \pm 12,23$. По стадиям заболевания: 25 (86,2%) пациенток были со II стадией, 4 (13,8%) пациенток с III стадией. По иммуногистохимии опухоли у 3 (10,3%) больных был Люминальный тип А, у 21 (72,4%) больной - Люминальный тип В, Трижды негативный тип опухоли выявлен у 4 (13,8%) пациенток и у одной (3,4%) пациентки HER позитивный рак.

Результаты анализа очагов γ -H2AX в контрольной и основной группе (этап 1) по каналу разрывов (FITC) и каналу репарации (APC): Выявлено, что в канале разрывов FITC три показателя статистически значимо различаются между двумя сравниваемыми группами. Статистическая разница обнаружена для показателя «Средний диаметр ядра», который в основной группе был выше показателя контрольной группы ($p = 0,0382$), и показателя «Среднее значение интенсивности для всех очагов», он в основной группе был ниже, чем в контрольной группе ($p = 0,0166$). Показатель «Количество перекрывающихся очагов в двух каналах» в основной группе был выше, чем в контрольной группе ($p = 0,0486$). При сравнении показателей основной и контрольной групп на канале репарации APC, выявлены два статистически значимых показателя. Достоверные различия обнаружены для показателя «Ядра с повышенной

интенсивностью свечения», который в основной группе был ниже показателя контрольной группы ($p = 0,0166$), и показатель «Среднее значение интенсивности для всех очагов» в основной группе был ниже чем в контрольной группе ($p = 0,0118$).

Результаты статистического однофакторного прогнозирования целевого показателя развития рака молочной железы «РМЖ,+» для количественных и бинарных факторов. 12 факторов имеют статистическую значимость влияния на риск развития «РМЖ, +» с диапазоном уровней рисков от 69,0% до 100,0%. Лидирующими статистически значимыми факторами развития РМЖ с риском от 75,0% до 81,0% являются «Возраст, лет $\geq 48,0$ », «Среднее значение интенсивности для всех очагов (Этап 1) $< 341,6$ » и «Возрастные группы (После 50 лет)».

Прогностическая оценка анализа очагов γ -H2AX в качестве диагностического маркера проведена с помощью ROC-анализа. Установлено, что модель имеет «хорошее» и «среднее» качество прогноза диагностического маркера для показателя «Среднее значение интенсивности для всех очагов» по каналам разрывов FITC (0,70) и репарации APC (0,69), соответственно ($P=0,001$).

Анализ динамики показателей по каналу разрывов FITC и репарации APC по периодам ХТ: «Этап 1», «Этап 2», «Этап 3» и «Этап 4». Полученные данные показали, что во время проведения химиотерапии два показателя по каналу разрывов FITC статистически значимо различаются: показатели «Среднее значение интенсивности для всех очагов» ($p = 0,0075$), «Количество перекрывающихся очагов в двух каналах» ($p = 0,0237$). Полученные данные позволяют сделать выбор о значительной реакции организма на проведение 1-го курса химиотерапии.

В рассматриваемый период времени в канале репарации APC девять показателей статистически значимо изменяются: количество клеток с очагами ($p=0,0465$), общее количество очагов ($p=0,0007$), количество обнаруженных кластеров ($p=0,0020$), среднее количество очагов в клетке ($p<0,0001$), среднее значение всех очагов в клетке ($p=0,0003$), процент поврежденных клеток ($p<0,0001$), среднее значение всех очагов в кластере с низкой интенсивностью ($p<0,0001$), среднее значение всех очагов в кластере с низкой интенсивностью в кластере ($p=0,0003$), процент ядер с очагами в кластерах с низкой интенсивностью ($p=0,0021$). Выявленные статистически значимые изменения по 11 показателям в канале репарации APC с особыми сдвигами перед началом 2 курса ХТ свидетельствуют об ответе организма на проводимую химиотерапию, проявляющемся усилением процесса репарации разрывов ДНК у пациенток с РМЖ.

Динамика соотношений двуцепочечных разрывов/репараций. Мы выявили, что все показатели параметров γ -H2AX по каналам репарации APC статистически значимо выше чем по каналу разрывов FITC.

В исходе исследования из 29 пациенток у двух женщин исход неизвестен (дислокация), умерло четверо. Трех-годичная выживаемость составила 85%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе были изучены эпидемиология рака молочной железы, генотипирование с проведением ПЦР и NGS секвенирование у больных РМЖ и проведено пилотное исследование анализа очагов γ H2AX как биомаркера ответа на химиотерапию рака молочной железы путем мониторинга двухцепочечных разрывов ДНК в лимфоцитах у больных с раком молочной железы на платформе AKLIDES.

На основании полученных результатов проведенного нами исследования можно сделать следующие выводы:

1. Анализ динамики впервые выявленных случаев и общей заболеваемости РМЖ показал рост заболеваемости $R^2=0,3955$ ($p<0,021$) и $R^2=0,9188$ ($p<0,001$) соответственно. Прогнозируемое количество впервые выявленных случаев РМЖ в 2025 году составит 218 случаев. Прогнозируемая общая заболеваемость в 2025 году вырастет до 1766 заболевших.
2. В Актюбинской области полиморфизм гена BRCA1 (5382insC) выявлен в 0,72% и 300T>G (Cys61Gly) в 0,36% женщин с раком молочной железы по методу ПЦР.

При NGS секвенировании выявлены 6 статистически значимых полиморфизма генов ATM (rs1800057), RARG (rs2229774), BRCA2 (rs11571833), MAP3K1 (rs889312), FGFR2 (rs2981582), BRIP1 (Rs137852985) ассоциированных с высоким риском развития рака молочной железы у казашек Актюбинской области.

3. Выявленные статистически значимые изменения показателей по каналам разрывов FITC и репарации APC очагов γ H2AX в лимфоцитах у женщин с раком молочной железы и доброкачественными заболеваниями позволяют использовать очаги γ H2AX в качестве диагностического маркера для выявления рака молочной железы. Прогностическая модель оценки анализа очагов γ -H2AX в качестве маркера диагностики РМЖ показала «хорошее» и «среднее» качество прогноза для показателя «Среднее значение интенсивности для всех очагов» по каналам разрывов FITC (0,70) и репарации APC (0,69).

Статистически значимые результаты позволяют использовать анализ очагов γ -H2AX в лимфоцитах пациенток рака молочной железы в качестве возможного раннего индикатора оценки эффективности химиотерапии.