

НАО «Западно-Казахстанский медицинский университет
имени Марата Оспанова»

УДК:618.19-006.6:616-036.2

На правах рукописи

АЙТМАГАМБЕТОВА МАРЖАН АЛТЫНБЕКОВНА

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

6D110100 – Медицина

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научный консультант
к.м.н., доц. Смагулова Г.А.
д.м.н., проф. 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

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	4
ОПРЕДЕЛЕНИЯ	5
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	7
ВВЕДЕНИЕ	9
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Эпидемиология рака молочной железы	15
1.2 Рак молочной железы, ассоциированный с мутациями BRCA и других генов	15
1.2.1 Особенности полиморфизма генов, ассоциированных с РМЖ	19
1.3 Очаги двухцепочечных разрывов γ -H2AX как биомаркер повреждения ДНК	22
1.3.1 Основные механизмы репарации двухцепочечных разрывов ДНК	26
1.3.2 Методы оценки ответа на терапию у пациенток с злокачественным новообразованием молочной железы	27
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	30
2.1 Общая характеристика работы	30
2.2 Дизайн исследования и основные характеристики материалов и методов исследования	30
2.3.1 Эпидемиология рака молочной железы в Актюбинской области в 2014-2018гг. и 2022г.	31
2.3.2 Определение стандартной диагностической панели полиморфизмов мутации генов BRCA 1, BRCA 2 у больных раком молочной железы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Этап А)	32
2.3.3 Next generation sequencing (NGS) секвенирование и проведение биоинформационного анализа генов у больных раком молочной железы (Этап Б)	33
2.3.4 Анализ очагов γ -H2AX как биомаркера ответа злокачественного процесса на химиотерапию у больных раком молочной железы путем мониторинга двухцепочечных разрывов ДНК в лимфоцитах на автоматизированной системе «АКЛИДЕС»	34
2.3.5 Методы статистической обработки данных	38
3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	41
3.1 Эпидемиология рака молочной железы в 2014-2018гг. и 2022г. в Актюбинской области	41
3.1.1 Распространенность полиморфизмов генов BRCA 1, BRCA 2 у больных раком молочной железы (Этап А)	43
3.1.2 Результаты NGS секвенирования и биоинформационного анализа генов у больных раком молочной железы (Этап Б)	45
3.2 Результаты анализа очагов γ -H2AX ДНР ДНК как биомаркера ответа злокачественного процесса на химиотерапию РМЖ	59
4 ОБСУЖДЕНИЕ	82
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	92

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	93
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	94
ПРИЛОЖЕНИЯ	111

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие документы и стандарты:

ГОСТ 2.001-2013- ГОСТ 1.0-2015 "Межгосударственная система стандартизации. Основные положения" и ГОСТ 1.2-2015 "Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены"

Закон Республики Казахстан «О науке» от 18.02.2011 года, № 407-IVЗРК (с изменениями и дополнениями по состоянию на 01.01.2022г.).

Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 4 июля 2022 года № ҚР ДСМ-63 Государственный общеобязательный стандарт послевузовского образования (Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан «Об утверждении государственных общеобязательных стандартов по уровням образования в области здравоохранения». Зарегистрирован в Министерстве юстиции Республики Казахстан 5 июля 2022 года № 2871).

ГОСТ 7.1-2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание.

Общие требования и правила составления.

ГОСТ 7.32-2017 (Межгосударственный стандарт). Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

Периодические протоколы диагностики и лечения злокачественных новообразований МЗ РК, протокол №56 от «01» марта 2019 года.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими определениями:

Аквидес – это инновационная автоматизированная система измерения и кинетического анализа двухцепочечных разрывов ДНК и механизмов восстановления в генетическом материале человека (Medipan, Германия). Метод позволяет надежно определять количество повреждений ДНК с помощью флуоресцентных очагов посредством цифровой иммунофлуоресценции, например, в лимфоцитах периферической крови человека (моноклеарных клетках).

Аллель – это различные формы одного и того же гена. У разных генов может быть разное количество аллелей.

Генотип – совокупность генов организма и их отношений между собой, в том числе аллелей и сцеплении генов в хромосоме.

Генетический полиморфизм (ГП) – различия между аллелями одного и того же гена, заключаются в незначительных вариациях его «генетического» кода. Большую долю в ГП вносят замены одного нуклеотида на другой и изменения числа повторяющихся фрагментов ДНК, которые осуществляются во всех структурных элементах генома: экзонах, интронах, регуляторных участках и т. д.

Двухцепочечный разрыв ДНК – это тип повреждения ДНК, при котором две комплементарные цепи двойной спирали ДНК повреждаются одновременно в местах, близких друг к другу.

Иммуногистохимия – метод идентификации специфичных антигенных свойств злокачественных опухолей.

Частота минорного аллеля (MAF) – это частота, с которой второй по распространенности аллель встречается в данной популяции. Они играют удивительную роль в наследуемости, поскольку варианты MAF, которые встречаются только один раз, известные как «одионые», управляют огромным количеством селекций.

Общая выживаемость – промежуток времени от момента начала специального лечения до смерти пациента, выражается в месяцах.

Рак – полигенетическое заболевание, с возникновением групп генов, непосредственно участвующих в развитии опухолей у человека, например, онкогены, гены-супрессоры опухолей, гены репарации ДНК, а также гены микроРНК (miRNA)

Секвенирование – группа методов определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК для получения формального описания её первичной структуры. Последний этап молекулярного анализа предварительно отобранного, клонированного и протестированного более простыми методами фрагмента ДНК.

Фенотип – совокупность всех признаков и свойств организма, которые выявляются в процессе индивидуального развития в данных условиях и

являются результатом взаимодействия генотипа с комплексом факторов внутренней и внешней среды.

Экспрессия генов – это процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт — РНК или белок. Экспрессия генов может регулироваться на всех стадиях процесса реализации генетической информации: во время транскрипции, во время трансляции, и на стадии посттрансляционных модификаций белков.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АФК	–	активные формы кислорода
ВОЗ	–	всемирная организация здравоохранения
ДИ	–	доверительный интервал
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДЦР	–	двухцепочные разрывы
КИ	–	клиническое исследование
КПДЛ РМЖ	–	клинический протокол диагностики лечения рака молочной железы
ЛТ	–	лекарственная терапия
МЖ	–	молочная железа
ОВ	–	общая выживаемость
НРМЖ	–	наследственный рак молочной железы
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
ПХТ	–	полихимиотерапия
аПХТ	–	адьювантная полихимиотерапия
мтДНК	–	митохондриальная ДНК
МЦ ЗКМУ им.М.Оспанова	–	Медицинский Центр Западно-Казахстанского медицинского Университета имени Марата Оспанова
неоПХТ	–	неoadьювантная полихимиотерапия
РМЖ	–	рак молочной железы
ядНК	–	ядерная ДНК
ЭРОБ	–	Электронный регистр онкологических больных
AKLIDES	–	инновационный медицинский прибор для измерения и кинетического анализа двухцепочечных разрывов ДНК
ASCO	–	American Society of Clinical Oncology (Американское общество клинической онкологии)
АТМ	–	ataxia teleangiectasia mutated (мутантный при атаксии-телеангиэктазии белок)
АРС	–	маркер репарации двухнитевых разрывов ДНК
ВІС	–	Breast Cancer Information Core (Информационный центр рака молочной железы)
BRCA 1 и 2	–	(BReast Cancer Associated) гены 1 и 2
МАРЗК1	–	(митоген-активированная протеинкиназа-киназа 1) представляет собой ген, кодирующий белок
NCCN	–	National Comprehensive Cancer Network (Национальная всеобщая онкологическая сет, США)
NIHRI	–	National Human Genome Research Institute (Национальный институт изучения генома человека, США)
Nuclei with foci	–	количество клеток с очагами
Founder effect	–	эффект предшественника

- FITC – маркер двухнитевых разрывов ДНК
- RESIST – Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (Критерии клинического ответа солидных опухолей)
- TNM – TNM Classification of Malignant Tumours: Tumor, Nodus, Metastasis (международная классификация стадий развития раковых опухолей)
- PARP – Poly (ADP-ribose) polymerase (ингибитор поли-АДФ-рибоза-полимераз)
- PI3K – Phosphoinositide 3-kinases (фосфоинозитид-3-киназой протеинкиназ или ДНК-зависимая протеинкиназа)
- PI-3K – PI 3-kinases (фосфатидилинозитол-3-киназы)
- SNP – Однонуклеотидный полиморфизм
- γ -H2AX – фосфорилирование гистона H2AX

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Рак молочной железы (РМЖ) одно из наиболее распространенных злокачественных заболеваний у женщин во всем мире, и основная причина смерти от рака [1]. 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 [2]. 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 [2,с. 1]. 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%) [3]. По данным Аналитического обзора «О состоянии онкологической службы Актыобинской 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%) [4].

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 [5]. 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, ATM и др. Выявленные наследственные мутации увеличивают риск развития онкозаболевания [6]. 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 [7].

В настоящее время в Казахстане проводятся исследования по выявлению ассоциаций однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и мутаций не BRCA1 и не BRCA2 связанных генах с риском развития РМЖ в казахской популяции.

Однако, подобных работ в Актюбинской области не проводилось, что представляет определённый научно-практический интерес.

Исследование мутации генов, связанных с риском развития РМЖ у женщин казашек, позволит выявлять наследственную предрасположенность и осуществлять раннюю 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 [8-10].

Эффективность химиотерапии преимущественно основывается на разрушении быстро делящихся раковых клеток путем индукции различных видов повреждения ДНК. Наиболее опасным типом повреждения 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 [11]. 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 [12-15]. Анализ очагов фосфорилированного гистонового белка 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 [16, 17]. 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 [18], а также проводить вычислительный анализ очагов γ -H2AX, который в настоящее время успешно подтвержден несколькими независимыми исследовательскими группами [19-23]. 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 РМЖ 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 раку молочной железы 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) 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 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 Актыобинской 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 рискованных 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. 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 неинвазивного 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 №: 0118РК01065, 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 0117РК00036, 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.

Результаты внедрения исследования в практическое здравоохранение и образовательный процесс

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.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эпидемиология рака молочной железы

Рак молочной железы является наиболее распространенным видом рака у женщин и серьезной проблемой системы здравоохранения во всем мире [24]. В 2020 году во всем мире было зарегистрировано 19,2 миллиона новых случаев и 9,9 миллиона случаев смерти от РМЖ [25]. Эпидемиологический анализ рака выявил значительную разницу в заболеваемости между развитыми и развивающимися странами. Почти 60% всех случаев рака диагностируется в развивающихся странах [26]. На основе данных веб-платформы GLOBOCAN 2020, оценочный стандартизированный по возрасту коэффициент заболеваемости среди женщин с раком молочной железы показал высокие показатели в Австралии и Новой Зеландии (95,5 на 100 000), тогда как самые низкие показатели – в Юго-Восточной Азии, Центральной Африке и на юге – Центральной Азии (26,2, 32,7 и 41,2 на 100 000) [2, с. 4].

В 2020 году по данным GLOBOCAN самые высокие показатели смертности выявлены в Меланезии 27,5 на 100 000, в Восточной Африке 22,3 на 100 000, в Центральной Азии 18 на 100 000. В то же время низкие показатели наблюдались в Восточной Азии – 9,8 на 100 000 и в Центральной Америке – 10,4 на 100 000 [2, с. 4].

По программе CONCORD-3 в азиатских странах общая выживаемость варьируется от 66,1 до 88%. Высокие показатели 5-летней выживаемости наблюдались в Израиле 88%, Японии 85%, Турции 82,1%, низкие показатели в Монголии 76,1%, Индии 66,1% и в Малайзии 65% [4, с. 9]. Рак молочной железы имеет большое значение во всей Азии, включая Центральную Азию, в последние годы наблюдается рост заболеваемости в Казахстане [27-29].

В Казахстане заболеваемости раком молочной железы составляют 37,2, а смертность – 14,8 на 100 000 за 2020 год [3, с. 6]. По данным Шертаевой А.Б. с соавторами установлено, что в Актыубинской области в 2017–2021 гг. показатели выживаемости при раке молочной железы были низкими 12,1±0,9 мес (95% ДИ: 10,3–13,9 мес) ($p \leq 0,05$) [30].

1.2 Рак молочной железы, ассоциированный с мутациями BRCA и других генов

Рак молочной железы представляет собой сложную патологию, определяемую как генетическими, так и негенетическими факторами и, в большинстве случаев, без четкого наследования [5, с. 3].

К негенетическим факторам риска РМЖ у женщин относится репродуктивный анамнез. Гормональный фон также влияет на течение болезни. Женские репродуктивные гормоны, такие как эстрогены, прогестерон и пролактин, оказывают большое влияние на РМЖ и контролируют постнатальное развитие молочных желез [31]. Большинство гормональных факторов риска связаны с эстрогенами. Известно, что длительное воздействие эстрогенов связано с повышенным риском РМЖ. Факторами гормонального риска

считаются ранний возраст менархе, позднее начало менопаузы, длительный менструальный анамнез, недоношенность, недавнее использование постменопаузальной гормональной терапии или оральных контрацептивов, поздний возраст при первых родах и ожирение [32-34]. Существует ряд негормональных факторов риска, связанных с развитием РМЖ, которые косвенно влияют на действие эстрогенов, например, длительность ионизирующего излучения, потребление алкоголя и факторы питания [35,36].

К генетическим факторам риска относится семейный анамнез, связанный с риском развития рака молочной железы [37].

С началом всемирного проекта «Геном человека» в 1990 году отмечен значительный прогресс в открытии генов. Одним из самых первых анализов для выявления бессимптомных мутации является генетическое тестирование у пациентов с наследственным раком молочной железы и яичников (НРМЯ). В 5-10% всех случаев РМЖ выявляется наследственный или семейный рак молочной железы, вызванный мутациями в определенных генах [38,39]. При этом, 20-40% случаев наследственного рака молочной железы связаны с мутациями в генах BRCA1 и BRCA2, ассоциированных с РМЖ [40]. Установлено, что женщины с выявленными мутациями BRCA1 и BRCA2 на протяжении всей жизни находятся в группе очень высокого риска развития рака молочной железы и яичников [41,42]. Метаанализ проведенный Chen S. в 2007 году показал, что «у носителей мутации BRCA1 вероятность развития рака молочной железы составляет 57-65%, а у носителей BRCA2 – 45-49%» [43].

РМЖ, вызванный несколькими мутациями генов с высокой пенетрантностью, является наиболее устойчивой моделью предрасположенности к раку. Чаще всего примерами мутации, предрасполагающих к заболеванию, являются: BRCA1, BRCA2, p53, PTEN, STK11 и CDH1, и умеренной пенетрантностью в CHK2, ATM, RAD51C, BRIP1 и PALB2 [44,45]. Таким образом, генез РМЖ связан с патогенным вариантом определенных генов, причем более чем в 90% случаев патогенные варианты выявляются в BRCA1 / BRCA2 и наследуются по аутосомно-доминантному типу [46]. К 70 годам патогенный вариант BRCA1 / BRCA2 увеличивает риск развития РМЖ на 65% (44–78%) и 45% (31–56%), соответственно, а рака яичников – на 39% (18–54%) и 11% (2,4–19%), соответственно [47].

BRCA означает «ген BReast CAncer», что указывает на его значимость в патогенезе РМЖ. Однако сам ген не вызывает РМЖ. Вместо этого BRCA1 / BRCA2 участвуют в репарации ДНК других генов, вызывающих рак человека. BRCA1 и BRCA2 – это два разных гена супрессии рака, которые необходимы для активной репарации ДНК в ответ на клеточный стресс [48,49]. BRCA1 / BRCA2 играют решающую роль в ремоделировании хроматина, контроле транскрипции, регуляции клеточного цикла и процессах репарации ДНК [50]. Тем не менее, подробные механизмы канцерогенеза, индуцированного патогенными вариантами зародышевой линии BRCA1 / BRCA2 в тканях РМЖ и яичников, еще не раскрыты [51,52]. Ген BRCA1 был идентифицирован с помощью позиционного клонирования в 1994 г. Ген расположен на хромосоме 17q21 и

имеет 22 экзона. Он кодирует ядерный белок длиной 1863 аминокислоты. BRCA1 экспрессируется в различных тканях, включая ткани молочной железы и яичников [53]. Ген BRCA2 расположен на хромосоме 13q12-13, имеет 27 экзонов и выделен в 1995 г. [54, 55]. BRCA1 и BRCA2 имеют сходные структуры экзонов, но не обладают гомологией последовательностей [56-58].

По данным Kadouri L. (2007) и др. авторов «в гене BRCA 1 идентифицировано более 1536 различных полиморфизмов и в гене BRCA 2 – около 1885, также зарегистрировано более 600 различных миссенс вариантов обоих генов» [59]. По данным Marchetty P. (2004) «частота выявления мутаций зависит от географического региона проживания и этнической принадлежности. При этом основную долю мутаций в гене BRCA 1 во всем мире составляют следующие полиморфизмы: 185 delAG, 5382 insC, C61G, а в гене BRCA 2: 6174 delT, K3326X, 3036del4, 6503delTT» [60].

Большинство встречающихся мутаций аккумулируется в международной базе данных Breast Cancer Information Core (BIC), которую курирует Национальный институт изучения генома человека (National Human Genome Research Institute)» [61]. Наиболее распространенными мутациями в гене BRCA1 являются 185delAG, 5382insC, 4427T>C, в гене BRCA2 – 6174delT, H372N, 10590A>C и 6503delTT.

Вариации в распределении мутаций зависят от разных этногеографических регионов. Finkelman B.S., (2012) установлено, что «относительно небольшие, биологически изолированные этносы характеризуются «эффектом родоначальника» («founder effect»), т.е. преобладанием повторяющихся мутаций в генах BRCA1 и BRCA2. Наиболее частой мутацией, является вариант 5382insC ашкеназских евреев, который был обнаружен примерно у 10% носителей мутации. Это одна из наиболее распространенных мутаций BRCA1, выявленных во всем мире, и она встречается как у евреев-ашкенази, так и у женщин славянского происхождения» [62]. В России преобладают спектр из пяти повторяющихся мутаций (5382insC, c61G, 185delAG, 4154delA, 2080delA), которые охватывают до 90% всего спектра [63].

В Восточном регионе Республики Казахстан обнаружены мутации генов BRCA1 (5382insC (7,7%), c.2311T>C (22,4%), c.4308T>C (8,8%)) и TP53 (rs1042522 (16,4%)) [64]. Казахский институт онкологии и радиологии и Институт общей генетики и цитологии провели исследование на 194 женщин казахской популяции, методом секвенирования нового поколения. Наиболее распространенными патогенными вариантами были c.5329dupC и c.5341-2delA (c.5278-2delA) в гене BRCA1, на которые приходилось 10,7% (n = 6/56) и 8,9% больных (n = 5/56), соответственно [65]. Недавно проведено диссертационная работа Жаппарова Е.И. по изучению частоты встречаемости однонуклеотидных полиморфизмов, коррелирующих с риском развития рака молочной железы у больных и условно здоровых женщин казахской популяции. Выявлены следующие полиморфизмы: rs4646, rs1065852, rs4244285, rs67376798, rs6504950, rs2229774, rs1800056, rs16942, rs4987047 [66].

В 1984 году Н. Lynch на основе изучения родословных предложил критерии для выделения наследственного рака в целом и РМЖ в частности. «Для наследственных форм РМЖ характерны следующие признаки: 1) факт семейного накопления; 2) вертикальная передача заболевания; 3) ранний возраст начала заболевания; 4) двусторонность или полифокусность поражения, специфические опухолевые ассоциации, 5) первично-множественные раки. Факт семейного накопления и ранний возраст манифестации заболевания являются кардинальными признаками всех случаев наследственного рака, в том числе и РМЖ» [67].

Мутации передаются из поколения в поколение по доминирующей менделевской схеме, что означает, что у каждого потомства есть 50% шанс наследовать родительскую мутацию [68]. В наше время доступно генетическое тестирование, которое определяет наличие мутации в любом гене [69]. Рекомендуется, чтобы члена семьи с РМЖ и / или рака яичников протестировали первым на наличие мутации генов BRCA1 или BRCA2 [70]. При обнаружении мутации у члена семьи, остальные члены, у которых не был диагностирован РМЖ и / или яичников, должны быть проверены на наличие у них мутации. При выявлении положительного результата у них имеется повышенный риск развития рака.

Национальная комплексная сеть по борьбе с раком (NCCN) выработала клинические рекомендации для тестирования на мутации BRCA и для лечения людей, которые имеют мутацию в генах BRCA1, BRCA 2 [70, с. 6]. Генетическое тестирование рекомендуется, если у человека есть одна или несколько из следующих семейных характеристик:

1. Лица, имеющие любого кровного родственника с известным патогенным/вероятно патогенным вариантом гена предрасположенности к раку.

2. Лица, отвечающие указанным ниже критериям, но получившие отрицательный результат при предыдущем ограниченном тестировании (например, одиночный ген и/или отсутствие анализа дупликации делеций) заинтересованы в проведении мультигенного тестирования

3. Анамнез жизни:

- Рак молочной железы выявлен в возрасте ≤ 45 лет или 46–50 лет

- Второй рак молочной железы диагностирован в любом возрасте или ≥ 1 близкий кровный родственник с РМЖ, яичников, поджелудочной железы или простаты в любом возрасте

- В возрасте до 60 лет диагностирован тройной негативный рак молочной железы

- Еврейское происхождение ашкенази

- ≥ 1 близкий кровный родственник с раком молочной железы в возрасте до 50 лет или раком яичников, поджелудочной железы, предстательной железы рак в любом возрасте или ≥ 3 общих диагнозов рака молочной железы у пациентки и/или ее близких кровных родственников

Рекомендуется, чтобы любое лицо, отвечающее одному из вышеуказанных критериев, было направлено к профессиональному генетическому консультанту для оценки рисков.

Если женщина дает положительный результат на одну из мутаций BRCA, то необходимо следовать рекомендациям, разработанным Национальной комплексной сетью по борьбе с раком (2021г.).

Рекомендуемое ведение пациентов, у которых выявлена мутация BRCA, включает следующее:

- Обучение пальпации молочных желез с регулярной ежемесячной практикой следует начинать с 18 лет, а клинические обследования молочных желез следует проводить каждые 6–12 месяцев, начиная с 25-летнего возраста.

- В возрасте от 25 до 29 лет женщине следует ежегодно проходить МРТ молочных желез с контрастированием (выполняется на 7–15 день менструального цикла для женщин в пременопаузе) или ежегодные маммографию, только если МРТ недоступна.

- Возраст для начала скрининга может быть индивидуализирован, если семейный анамнез включает диагноз молочной железы до 30 лет.

- Послетестовое консультирование женщин с подтвержденным патогенным или вероятно патогенным вариантом BRCA1/2 (или с подозрением на этот вариант на основании наличия известного патогенного или вероятно патогенного варианта в семье) включает обсуждение риск-снижающей мастэктомии и или профилактической овариэктомии. Консультирование по поводу этих снижающих риск операций должно включать обсуждение степени снижения/защиты от рака, рисков, связанных с операциями, вариантов реконструкции молочной железы, лечения симптомов менопаузы и обсуждения репродуктивных желаний.

- Для лиц, которые не выбирают профилактическую овариоэктомию, рекомендуется одновременное трансвагинальное УЗИ и определение уровня СА-125 раз в полгода, начиная с 35 лет или на 5-10 лет раньше, при диагностированном случае рака яичников в семье

- Рассмотреть варианты химиопрофилактики (например, тамоксифен).

Таким образом, в Республике Казахстан были идентифицированы мутации генов BRCA1 (5382insC (7,7%), с.2311T>C (22,4%), с.4308T>C (8,8%)) и TP53 (rs1042522 (16,4%) и наиболее распространенными патогенными вариантами были с.5329dupC и с.5341-2delA (с.5278-2delA) в гене BRCA1, на которые приходилось 10,7% (n = 6/56) и 8,9% больных (n = 5/56), соответственно.

Несмотря на проведенные ранее исследования, по Актыбинской области данных нет, поэтому для нас представлял интерес определить частоту мутации генов и случаев семейного рака. В нашей стране еще не разработаны рекомендации для генетического тестирования членов семей пациенток с выявленным раком молочной железы.

1.2.1 Особенности полиморфизма генов, ассоциированных с РМЖ

Рак является наиболее распространенным генетическим заболеванием, возникающим в результате накопления генетических изменений. Эти генетические изменения делятся на 2 основные категории: зародышевые и соматические. Изменения зародышевой линии обнаруживаются в зародышевой клетке; следовательно, этот тип изменения может быть унаследован от родителей к потомству; соматические мутации — это клеточные изменения, которые случайным образом приобретаются в течение жизни после воздействия различных канцерогенов или старения, повреждающих ДНК. Как зародышевые, так и соматические изменения играют ключевую роль в предрасположенности людей к раку и в инициации, а также в прогрессировании рака. Следовательно, генетические изменения могут служить эффективными биомаркерами для раннего выявления, мониторинга и прогнозирования рака.

Рак является болезнью генома, и огромные усилия исследователей направлены на понимание этого разнородного набора болезней [71]. Расширение наших знаний о геномах рака, в основном, обусловлено быстрым развитием технологий секвенирования на всем пути от ранней идентификации онкогенов и опухолевых супрессоров до полной аннотации наиболее распространенных видов рака, что привело к распознаванию геномного ландшафта рака [72].

Определение геномного ландшафта рака — это непрерывный процесс, поддерживаемый базой данных «Атлас генома рака» (TCGA), который включает геномные показатели из более чем 10 000 тысяч образцов опухолей, предоставляя каталог ключевых геномных изменений в более чем 30 типах рака. Основные достижения в технологиях секвенирования, за которыми последовала разработка вычислительных инструментов, позволили внедрить такие анализы, как секвенирование всего экзона (WES), секвенирование РНК (RNA-seq) и секвенирование всего генома (WGS) в рутинные клинические условия, тем самым поддерживая растущую клиническую значимость геномики в онкологии [73]. Геном рака несколько динамичен, и каждый рак развивается с накоплением нескольких типов соматических мутаций, изменений числа копий, эпигенетических факторов и структурных вариантов. С другой стороны, быстрое развитие биоинформатики и биотехнологии, способствовавшие значительному прогрессу «эры омики», позволило расширить скрининг от одного гена до всего генома, используя полногеномное генотипирование для полногеномных ассоциативных исследований (GWAS) или секвенирование следующего поколения (NGS) для изучения профиля генома рака [74]. При этом, важным методом изучения молекулярных механизмов патогенеза опухолей и выявления биомаркеров, позволяющих проводить раннюю диагностику и выявлять терапевтические мишени, является основанный на высокопроизводительном секвенировании биоинформационный анализ.

Несколько баз данных открытого доступа, таких как каталог GWAS [75], NCI Genomic Data Commons [76], ClinVar [77], ClinGen [78], Snpedia (<https://www.snpedia.com/>), Ensembl (<https://ensembl.org>) и NCBI

(<https://www.ncbi.gov/snp/>), были созданы для предоставления исследователям доступа и помощи в интерпретации крупномасштабными геномными данными.

Самым первым GWAS, опубликованным среди других GWAS по раку, был рак молочной железы. В 28 исследованиях идентифицировано 70 локусов для трансэтнических популяций, 70 для европейцев, 8 для жителей из Восточной Азии, 3 для африканцев, 2 для латиноамериканцев и 1 для евреев-ашкенази, которые были связаны с предрасположенностью к раку молочной железы [79].

Также существуют «не - BRCA» унаследованные гены рака молочной железы, которые включают как высоко пенетрантные гены (например, PALB2, TP53, PTEN и CDH1) [80] так и гены с умеренной пенетрантностью (например, ATM, BRIP1 и CHEK2) [81]. Гены, считающиеся высоко пенетрантными, определяются как > 4-кратный риск, а гены, считающиеся умеренно пенетрантными, имеют 2-4-кратный риск развития рака [82].

Кроме того, существуют однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), выявленные внутри или вне генов, которые имеют двукратный риск. Они являются низко пенетрантными [80, с. 6], однако, в сочетании могут использоваться для получения оценки полигенного риска, то есть при наличии нескольких низкопенетрантных аллелей у одного человека могут быть предрасполагающим фактором развития РМЖ.

Крупные исследования «случай-контроль» выявили варианты в генах репарации ДНК CHEK2, ATM, BRIP1 и PALB2 которые дают примерно двукратный риск рака молочной железы, но такие варианты редки в популяции [83-86].

Для нас представляют интерес краткая характеристика полиморфизмов следующих генов, ассоциированных с РМЖ по данным GWAS [87].

Ген ATM (ATM Serine/Threonine Kinase) кодирует одноименный белок — серин/треониновую протеинкиназу ATM и находится на хромосоме 11q. ATM-белок активируется при разрывах нитей ДНК и фосфорилирует несколько ключевых белков. Эти белки, в свою очередь, инициируют остановку клеточного цикла, запускают репарацию ДНК или апоптоз [88]. При мутациях гена ATM снижается количество кодируемого им белка и происходит его инактивация. Это ведет к сбою процессов репарации ДНК, нарушению клеточного цикла, подавлению апоптоза [89,90]. Как следствие, могут возникнуть нарушения нормального процесса онтогенетической перестройки генов иммуноглобулинов, ведущие к генетической нестабильности и канцерогенезу. С мутациями гена ATM ассоциированы различные виды рака: лейкозы, лимфомы, рак молочной железы и мочевого пузыря [91].

Ген FGFR2 находится на длинном плече 10-й хромосомы в локусе 10q26.13 и содержит 24 экзона [92]. Белок, кодируемый геном, является членом семейства рецепторов фактора роста фибробластов. FGFR2 является рецепторной тирозинкиназой, которая амплифицируется и сверхэкспрессируется в 5-10% опухолей молочной железы [93,94]. Соматические миссенс-мутации FGFR2, которые, наиболее вероятно, связаны с развитием рака, также были

продемонстрированы в первичных опухолях и клеточных линиях многих типов опухолей (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>) [95].

Ген митоген-активируемой протеинкиназы киназы 1 (MAP3K1), расположен в хромосоме 5q11.2, кодирует серин/треонинкиназу, которая участвует в сигнальном пути митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК). Трансдукция сигнала МАРК регулирует транскрипцию важных генов рака, включая c-Myc, c-Elk1, c-Jun и c-Fos [96]. Однонуклеотидный полиморфизм (SNP) rs889312 в MAP3K1 был идентифицирован как связанный с риском рака молочной железы с помощью GWAS [97] подтвержденный связью в популяции европейского происхождения исследованием Garcia-Closas, 2008 [98]. GWAS, проведенный у субъектов европейского происхождения, показал, что минорный аллель MAP3K1 rs16886165 был связан с повышенным риском рака молочной железы в гетерозиготных кодоминантных и гомозиготных кодоминантных генетических моделях [99].

Рецепторы ретиноевой кислоты (RAR) расположен на 17q112 хромосоме, принадлежат к большому семейству лиганд-чувствительных генов-регуляторных белков, которое включает рецепторы стероидных и тиреоидных гормонов. Эти белки содержат два высоко консервативных домена, участвующих в определении их активности связывания ДНК и лиганда. Были идентифицированы три различных RAR (RAR альфа, бета и гамма), которые кодируются генами на отдельных хромосомах.

BRIP1 - С-концевая геликаза 1, взаимодействующая с BRCA1, является членом пути белков анемии Фанкони с установленной ролью в репарации межцепочечных сшивок ДНК [100]. Сообщается, что BRIP1 является третьим наиболее распространенным геном предрасположенности к раку яичников и молочной железы [101,102].

Несмотря на то, что в настоящее время в РК проводятся исследования по выявлению ассоциаций однонуклеотидных полиморфизмов и мутаций в других (не BRCA1 и не BRCA2) генах с риском развития РМЖ в казахской популяции, в Западном Казахстане подобные исследования ранее не проводились. Поэтому изучение SNP ассоциированных с риском развития РМЖ у женщин казашек Актюбинской области представляет научно-практический интерес.

1.3 Очаги двухцепочечных разрывов γ -H2AX как биомаркер повреждения ДНК

Фундаментальное исследование Ф. Крика и Д. Уотсона позволило расшифровать двухцепочечную структуру дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) – носителя наследственного кода клетки [103,104]. Такая двухцепочечная структура ДНК обеспечивает надежность: в случае разрыва (поломки) одной из цепей вторая послужит матрицей для восстановления точной последовательности нуклеотидов.

Однако при разрыве обеих цепей ДНК, которые появляются из-за воздействия эндогенных и экзогенных факторов (например, лучевая ионизация, химические соединения и др.), процессы репарации затруднены. Для изучения

процесса разрывов и репарации ДНК необходимы достоверные методы определения двухцепочечных разрывов (ДЦР) ДНК. Дефекты в генах репарации ДНК могут играть решающую роль в патогенезе рака. Недавние исследования мутационного ландшафта и анализ изменений экспрессии генов при разных типах рака выявили сильную корреляцию с нестабильностью генома и нарушением регуляции генов репарации ДНК [105].

В 1998 году впервые опубликовано исследование Rogakou E.P. о том, что образование гистона γ -H2AX является быстрым и чувствительным клеточным ответом на присутствие двухцепочечных разрывов ДНК. Было изучено влияние радиационного излучения на образование ДЦР ДНК клеточных линии млекопитающих и человека. Выявлено, что в местах воздействия появляются фосфорилированные формы гистона H2AX [106]. В культуре ткани под действием ионизирующего излучения на каждые 40 двухцепочечных разрывов ДНК обнаруживается примерно один крупный кариотипический дефект [107], который отражает несбалансированный геном и изменение клеточного метаболизма, что может привести к гибели клеток или прогрессированию опухолей.

По данным Watson, J. D. (2014) и др. исследователей «разработка антител, специфичных к H2AX, позволила выявить фосфорилирование H2AX, как маркер обнаружения повреждения ДНК и репарации в отдельных клетках *in situ*. Основными методами измерения уровней и кинетики H2AX являются иммуноокрашивание, проточная цитометрия, вестерн-блот, цифровая иммунофлуоресценция, и иммуноферментный анализ (ИФА). Перечисленные методы используются для обнаружения γ -H2AX *in vitro*, причем последние два обеспечивают объективную количественную оценку уровней H2AX» [108-111].

AKLIDES – инновационный медицинский прибор для измерения и кинетического анализа двухцепочечных разрывов ДНК и механизмов репарации / восстановления в генетическом материале человека. Метод позволяет автоматически и надежно определять количество повреждений ДНК с помощью флуоресцентных очагов посредством цифровой иммунофлуоресценции, например, в лимфоцитах периферической крови человека (моноклеарных клетках) [112].

Этот флуоресцентный микроскопический анализ недавно применен для создания быстрого и стандартизированного анализа γ -H2AX и обеспечения срочной оценки повреждений ДНК в клинической практике. В настоящее время автоматизированная система «АКЛИДЕС» является наиболее чувствительным и часто используемым методом в исследованиях повреждений ДНК. Она позволяет полностью автоматизировать скрининг антинуклеарных иммунофлуоресцентных антител [15, с. 11], и проводить количественный анализ очагов γ -H2AX, подтвержденный несколькими независимыми исследовательскими группами [20, с. 2].

Проведены исследования потенциального генотоксического радиочастотного воздействия мобильного телефона на моноклеарные клетки периферической крови человека *in vitro* на автоматизированной системе

AKLIDES [113]. Также опубликованы результаты исследования анализа очагов γ -H2AX у спортсменов во время покоя после физической нагрузки на автоматизированной системе AKLIDES. Показателями являлись анализ диаметра очагов γ -H2AX и количества очагов γ -H2AX на пораженную клетку [114].

Имеется опыт применения автоматизированной системы AKLIDES в Казахстане для диагностики системных аутоиммунных заболеваний, где изучались антинуклеарные антитела, цитоплазматические антинейтрофильные антитела, перинуклеарные антинейтрофильные антитела у пациентов с ревматоидными заболеваниями [115]. В частности, в 2023 году проведено исследование анализа количества двуцепочечных разрывов и репараций ДНК лимфоцитов периферической крови в группе условно здоровых детей и у пациентов с диагнозом «острый лейкоз» для оценки степени повреждения ДНК с помощью системы Aklides (MEDIPAN, Германия) [116].

Для проведения данного исследования был выбран метод цифровой иммунофлуоресценции, с учетом преимуществ автоматизированной системы «АКЛИДЕС».

Повреждение ДНК – критическое событие, способное повлиять на функции и развитие клетки. Таким образом, для клеток важно поддерживать целостность ДНК и эффективно восстанавливать такие повреждения. Среди различных видов повреждений ДНК двухцепочечные разрывы (ДЦР) считаются наиболее опасным видом повреждения ДНК, а неправильное восстановление может привести к онкогенезу или гибели клеток [117, 118].

Исследователи сделали вывод, что двухцепочечный разрыв ДНК – это тип повреждения ДНК, при котором две комплементарные цепи двойной спирали ДНК повреждаются одновременно в местах, близких друг к другу [119,120]. Группа ученых Т. Tanaka, X. Huang и М. М. Vilenchik (2007) представили данные о том, что «в живых клетках ДНК подвергается постоянному процессу окислительного повреждения свободными радикалами кислорода (активные формы кислорода - АФК), которые образуются внутри клетки в результате метаболических процессов» [121]. Takahashi A., со авторами подсчитали, что «в одном клеточном цикле в результате продукции АФК может произойти не менее 5000 разрывов одной цепи ДНК. Приблизительно 1% всех разрывов ДНК являются двухцепочечными разрывами, которые происходят во время репликации ДНК, а оставшиеся 99% разрывов восстанавливаются. Таким образом, в течение клеточного цикла в одном ядре образуется около 50 так называемых «эндогенных» двухцепочечных разрывов. Накопление поврежденной ДНК, вызванного АФК, приводит к старению клеток и может быть причиной индукции неопластической трансформации» [122, 123].

Исследователи Rogakou E.P., Voon C., Redon C. (1999) утверждают, что центральным звеном многочисленных сигнальных путей, активируемых в ответ на ДЦР ДНК, является фосфорилирование гистона H2AX по серину – 139 (γ -H2AX). Фосфат присоединяется к кислороду молекулы серина в гамма-положении, поэтому данная модифицированная форма называется γ -H2AX.

Установлено, что фосфорилирование H2AX происходит в течение 20 секунд с момента образования ДЦР ДНК [10, с. 3] и после иммуноцитохимического окрашивания выявляются в виде ярких точек свечения, поэтому они получили название очагами белков репарации. В настоящее время признано, что каждый очаг γ -H2AX состоит из приблизительно 2000 молекул H2AX [10, с. 9] и представляет собой место репарации одиночных или множественных ДЦР ДНК [13, с. 3]. Таким образом, иммунофлуоресцентное окрашивание с антителом анти- γ -H2AX обеспечивает визуализацию ядерных очагов, коррелирующих с количеством двухцепочечных разрывов [14, с. 1].

Также вызывают интерес объяснение механизмов, вызывающих фосфорилирование H2AX, и его роль в передаче сигналов и репарации повреждений ДНК. Гистон H2AX является субстратом нескольких связанных с фосфоинозитид-3-киназой протеинкиназ (PIKK), таких как ATM (ataxia telangiectasia mutated), ATR (ATM и относящиеся к Rad3) или ДНК-зависимая протеинкиназа (DNA-PK). ATM киназа считается основным физиологическим медиатором фосфорилирования H2AX в ответ на образование двухцепочечных разрывов [124,125]. Было показано, что в течение нескольких минут воздействия ионизирующего излучения или других факторов, вызывающих двухцепочечные разрывы ДНК, H2AX фосфорилируется членами семейства фосфатидилинозитол-3-киназы (PI-3K) и образует локализованные «очаги» в местах ДЦР [126].

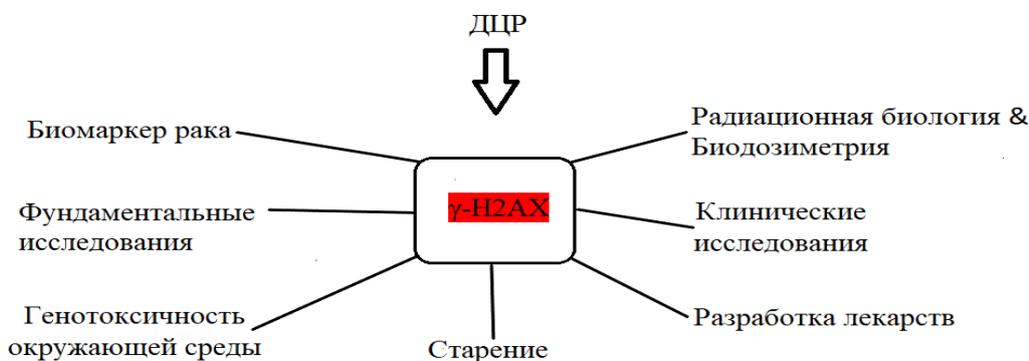


Рисунок 1 - Применения биомаркера γ -H2AX (адаптирован из статьи)

Примечание – Источник [127]

За последние пять лет, в трансляционных исследованиях все шире используется γ -H2AX для измерения биологического действия агентов, повреждающих ДНК, применяемых как в химиотерапии, так и в радиотерапии, включая открытие лекарств и тестирование *in vitro* [128]. Таким образом, γ -H2AX является универсальным маркером двухцепочечных разрывов ДНК. На рисунке

1 представлены возможности применения биомаркера для мониторинга клинических состояний и оценки эффективности лечения в исследованиях.

1.3.1 Основные механизмы репарации двухцепочечных разрывов ДНК

Репарация двухцепочечных разрывов ДНК и ее регуляция тесно интегрированы внутри клеток. Различные белки принимают участие в разных путях обнаружения и восстановления участков повреждения ДНК двухцепочечными разрывами [129]. Дефекты в механизме восстановления / репарации ДНК могут повышать уязвимость клеток для агентов, повреждающих ДНК, приводя к накоплению мутаций в геноме и способствуя развитию различных заболеваний, включая рак. Эпидемиологические данные подтверждают сильную связь между глобальной мощностью двухцепочечных разрывов ДНК с риском возникновения рака [130-132], радиационной чувствительностью [133,134] и реакцией на лечение рака [135,136]. Связь между генетическими дефектами репарации ДНК и повышенной клинической радиочувствительностью была выявлена во многих исследованиях и использована в качестве основы для разработки методов прогнозирования токсичности для нормальных тканей [137].

Важной особенностью γ -H2AX является то, что он является маркером образования двухцепочечных разрывов ДНК, тогда как белок 53BP1 является маркером репарации ДНК, образуя очаги путем транслокации. Кроме того, имеются значительные свидетельства в образовании очагов репарации повреждений ДНК с участием многих других белков. Белки 53BP1, NBS1 и MRE11 диссоциируют от очагов повреждения ДНК на митотической стадии, тогда как очаги γ -H2AX образуются на протяжении всего клеточного цикла [138-140]. В клетках млекопитающих двумя основными органеллами, содержащими ДНК, являются ядро и митохондрии. Существуют разные системы репарации ядерной ДНК (ядДНК) в зависимости от вида повреждения ДНК. В соответствии с исследованиями Носоюа Н. (2014) «основными путями при двухцепочечных разрывах ДНК являются: 1) рекомбинационная репарация, которая подразделяется на гомологичную рекомбинантную репарацию и негомологичное соединение концов разрывов ДНК и 2) альтернативное негомологичное соединение концов разрывов ДНК, также участвующее в репарации ДЦР» [141,142]. Пути репарации митохондриальной ДНК (мтДНК) также включают репарацию двухцепочечных разрывов и могут восстанавливать поврежденную ДНК для поддержания генетической целостности митохондрий, защищая мтДНК от окислительного повреждения и способствуя выживанию клеток [143,144].

Следовательно, основной путь репаративной системы ДНК можно предоставить как: повреждение ДНК \rightarrow экспрессия p53 \rightarrow репарация ДНК/апоптоз (при состоянии, угрожающем жизнедеятельности клетки) [145].

Основной задачей процесса репарации является исправление повреждений / разрывов ДНК, уменьшая вероятность появления мутаций, и тем самым возникновения опухолевого субстрата [146,147].

1.3.2 Методы оценки ответа на терапию у пациенток с злокачественным новообразованием молочной железы

Гистон γ -H2AX широко используется в качестве маркера в фундаментальных исследованиях в области молекулярной фармакологии [148,149], но его применение в качестве фармакодинамического маркера в клинических исследованиях является сравнительно недавней разработкой [150]. В последнее время резко возросло его применение для мониторинга повреждения ДНК, вызванного химиотерапией, у больных раком. Микроскопия позволяет различать клетки с малым количеством повреждений ДНК и клетки, потенциально находящиеся в состоянии апоптоза, поэтому она является предпочтительным вариантом для анализа γ -H2AX в образцах ткани и крови пациентов [14, с. 8].

Есть две основные причины для клинического использования γ -H2AX во время химиотерапии. Во-первых, γ -H2AX – это фармакодинамический биомаркер, позволяющий определить генотоксический потенциал новых противораковых препаратов у пациентов. Во-вторых, анализ γ -H2AX потенциально позволяет клиницистам адаптировать лечение к индивидууму с учетом чувствительности и / или предшествующего лечения. Помимо клинических испытаний фазы I, II и III для разработки лекарств, γ -H2AX в настоящее время используется в исследованиях фазы 0 (таблица 1). Известно о проведении более 35 клинических испытаний (КИ) с использованием γ -H2AX для оценки лекарственной реакции у онкологических больных. Сообщалось о применении γ -H2AX в качестве биомаркера в фазах I, II и III КИ, связанных с процессом разработки лекарств от рака. Более половины всех зарегистрированных протоколов с использованием γ -H2AX приходится на Фазу I испытаний, оценивающих безопасность и параметры фармакокинетики разрабатываемого лекарства. Анализ γ -H2AX применялся для изучения эффектов лекарств, различающихся по типу повреждения ДНК, которые они генерируют (ингибиторы топоизомеразы I, ингибиторы PARP, ДНК-алкилаторы и т. д.) [151]. Кроме того, практическое использование маркера для определения фармакодинамики продемонстрировано в фазе I КИ по исследованию уровней γ -H2AX в волосяных фолликулах бровей у пациентов, получавших ингибитор поли-АДФ-рибоза-полимераз (PARP). Это исследование показало четкую связь между уровнями γ -H2AX и ингибированием PARP [152]. Тем не менее, большинство клинических протоколов в настоящее время используют γ -H2AX для изучения эффективности комбинаций лекарственных средств. Такие КИ часто объединяют ингибитор PARP (например, олапариб и велипариб) с агентом, повреждающим ДНК (митомицин С, карбоплатин, циклофосфамид и т. д.) [14, с. 7]. Ферменты PARP активируют как одноцепочечные разрывы ДНК, так и ДЦР [14, с. 5]. При исследовании другой комбинации лекарств, включающих ингибиторы ДНК-метилтрансферазы отдельно или в комбинации с ингибиторами гистондеацетилазы, была продемонстрирована клиническая эффективность у пациентов с миелодиспластическим синдромом и острым

миелоидным лейкозом, а также повышение уровня γ -H2AX в лимфоцитах периферической крови [153].

Таблица 1 - Перечень клинических исследований с использованием анализа γ -H2AX для измерения эффектов химиотерапевтических препаратов у онкологических больных (Адаптировано из статьи (2012))

Заболевание	Препараты	Ткани для анализа	обнаружение γ -H2AX	Фаза	Ссылки и идентификатор ClinicalTrials.gov
Плоскоклеточный рак головы и шеи	Цисплатин / Ралтегравир (МК-0518)	Опухоль	М	0	NCT01275183
Солидные опухоли	Велипариб (АВТ-888) / иринотекан	Опухоль / МКПК	М	I	[157]
Отрицательный метастатический РМЖ Her-2	Велипариб / Карбоплатин	ЦКО	М?	I	[158]
Солидные опухоли и лимфомы	Велипариб / Топотекан	ЦКО / МКПК	М	I	[159]
Рак молочной железы	Олапариб (AZD2281)	Брови	М	I	[160]
Лейкоз	Клофарабин / Циклофосфамид	МКПК	FACS	I	[161]
МДС, ХМЛ, лейкопения и ОМЛ	5-азациитидин /энтиностат (MS-275)	МКПК	М	I	NCT00101179
Метастатические, неоперабельные или рецидивирующие солидные опухоли	Велипариб / митомицин С	Кровь (МКПК)	М	I	NCT01017640
Солидные опухоли; Носители мутаций BRCA1, BRCA2	Велипариб	МКПК / Кожа / Волосы	N / A	I	NCT00892736
Солидные опухоли или лимфомы	Велипариб / Циклофосфамид	Кровь (МКПК) / опухоль	М	I	NCT00810966
Острый лейкоз	цитостатики	Лимфоциты периферической крови	М		[115,с. 3]
<p>Сокращения – М - микроскопия (иммуноцитохимия или иммуногистохимия); FACS - Сортировка клеток с активацией флуоресценции; ЦКО - циркулирующие опухолевые клетки; МКПК - мононуклеарные клетки периферической крови; N / A-не указано Примечание - Источник [154-156]</p>					

γ -H2AX был впервые использован в клиническом исследовании для тестирования комбинации клофарабина и циклофосфамида у пациентов с рецидивирующим острым лейкозом [157-161]. В 12 из 13 образцов крови пациентов анализы γ -H2AX показали, что комбинация клофарабина и циклофосфамида вызывает большее количество повреждений ДНК по сравнению с монотерапией циклофосфамидом. На сегодняшний день γ -H2AX был использован в качестве фармакодинамического биомаркера в более чем трех десятках КИ широкого спектра лекарств, вызывающих повреждение ДНК, включая ДЦР, прямо или косвенно (таблица 1). Эти препараты включают ДНК-алкилирующие и / или сшивающие агенты, ингибиторы топоизомераз 1 и 2, аналоги нуклеозидов, митотический ингибитор, ингибиторы PARP и ингибиторы гистондеацетилазы [162]. Многие клинические протоколы, включающие анализ γ -H2AX, исследуют комбинации препаратов PARP (олапариб и велипариб) или ингибитора HDAC (энтинонат) с ДНК-связывающим противоопухолевым препаратом.

Оценка очагов γ H2AX была предложена в исследованиях для мониторинга и прогнозирования прогрессирования опухоли и ответа на лечение [163,164]. В перспективе анализ γ H2AX можно использовать для персонализации терапии с индивидуализацией протоколов химио- и лучевой терапии, для повышения эффективности, а также минимизации побочных эффектов и токсичности [165,166].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Общая характеристика работы

Данная работа проведена в МЦ ЗКМУ имени М.Оспанова и выполнена в рамках финансируемых 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 №118РК01065, 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 0117РК00036, руководитель - Рамазанова Б. А., КазНМУ им. Асфендиярова) МОН РК 2019г. 3) «Роль микроэлементного статуса, повреждений ДНК в развитии онкопатологии (на примере Актыобинской области)» руководитель – Батырова Г.А. внутривузovsky НТП 2020г.

Исследование состоит из трех основных задач, включающих эпидемиологию рака молочной железы, генетическое исследование, изучение разрывов и репарацию двухцепочечных разрывов ДНК в лимфоцитах.

Для решения 1 задачи исследования – информация получена из Электронного регистра онкологических больных Актыобинской области МЦ ЗКМУ им.М.Оспанова.

Для решения 2 задачи генетические исследования проведены в НПЦ ЗКМУ им.М.Оспанова г.Актобе и на базе лаборатории Национального Центра биотехнологий КН МОН РК, г. Астана.

3 задача выполнялась на базе НПЦ ЗКМУ им.М.Оспанова с использованием системы Aklides (MEDIPAN, Германия), состоящей из флюоресцентного анализатора и программного обеспечения AKLIDES Nuk.

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.

2.2 Дизайн исследования и основные характеристики материалов и методов исследования

Дизайн исследования и основные характеристики представлены в соответствии с этапами исследования на рисунке 2,3,4:

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.

2.3.1 Эпидемиология рака молочной железы в Актыобинской области в 2014-2018гг. и 2022г.

Дизайн исследования – эпидемиологический ретроспективный анализ. Сплошная выборка пациенток с верифицированным диагнозом РМЖ с 2014-2018 гг. и 2022г. в Актыобинской области (n=1083).



Рисунок 2 - Дизайн исследования. Этап 1

Был проведен ретроспективной 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) дата рождения, дата постановки диагноза рака, дата смерти, место проживания, этническое происхождение, социальный статус, морфологический тип опухоли и стадии рака. Данные о численности населения Актыобинской области для расчета заболеваемости от рака молочной железы были получены из Актыобинского регионального статистического управления (2014-2018гг. и 2022г.).

Возраст на момент постановки диагноза рассчитывался с использованием даты рождения и классифицировался как 20–39, 40–49, 50–59, 60–69 и 70+ лет. По этническому признаку все пациенты были разделены на казашек и другие национальности. Социально-экономический статус пациентки кодировался как работающие, безработные и пенсионеры. По месту жительства пациентки разделялись на городских и сельских жителей. Для определения

морфологического типа РМЖ использовали категории КПДЛ РМЖ (2019г): протоковая карцинома, дольковая карцинома и другие типы. Стадия рака диагностировалась с использованием классификации стадий МКБ-10 и кодировалась от I до IV.

2.3.2 Определение стандартной диагностической панели полиморфизмов мутации генов BRCA 1, BRCA 2 у больных раком молочной железы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Этап А)

Дизайн исследования – одномоментное поперечное исследование.



Рисунок 3 - Дизайн исследования. Этап 2

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 НЦЗ ЗКМУ имени Марата Оспанова [167]. Получено одобрение локальной комиссией по биоэтике (номер одобрения: № 20 от 11.09.2017). Письменное информированное согласие было взято от всех субъектов исследования.

В таблице 2 представлены клиничко-патологические характеристики, такие как возраст на момент постановки диагноза, стадия по системе TNM, ER, PR, экспрессия HER-2 и Ki-67 включенных в исследование.

Таблица 2 - Клиническая характеристика больных, включенных в исследование

Характеристика	N	%, (95% ДИ)
Возраст		
< 50 лет	70	25,1% (20.08-30.28)
> 50 лет	208	74% (69.72-79.92)
Стадия		
I	20	7,1% (4.16-10.23)
II	204	73,3% (68.19-78.58)
III	54	19,4% (14.77-24.08)
Размер опухоли		
T1 <2	30	10,7% (7.14-14.44)
T2 >2-<5	194	69,7% (64.39-75.18)
T3 >5	35	12,5% (8.69-16.49)
T4 Грудная стенка, кожа	19	6,8% (3.87-9.80)
IGH		
Luminal A	147	52% (47.01-58.75)
Luminal B	57	20,5% (15.76-25.25)
Her2NEU+	26	9,3% (5.93-12.78)
Triple negative	48	17,2% (12.82-21.71)
Национальность		
казашки	182	65,4% (59.88-71.06)
славянки	96	34,5% (28.94-40.12)
Семейный анамнез		
Всего	33	11,8% (8,7-15,6)
казашки	24	8,6% (5,33-11,93)
славянки	9	3,2% (1,16-5,32)

2.3.3 Next generation sequencing (NGS) секвенирование и проведение биоинформационного анализа генов у больных раком молочной железы (Этап Б) Дизайн исследования – случай контроль (рисунок 3).

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. Группы пациенток для забора биологического материала сформированы в соответствии с критериями включения: 149 пациенток казахской популяции с морфологически подтвержденным раком молочной

железы и 150 женщин контрольной группы. Забор биологического материала (периферическая венозная кровь) проведен у пациенток и лиц контрольной группы (условно здоровых женщин, не имеющие онкологического заболевания в анамнезе). Произведено выделение ДНК из биологического материала и лабораторный анализ на наличие SNP генов в биологических образцах.

Средний возраст 56 лет (95%ДИ:29,81-45,36). Положительный семейный анамнез выявлен у 15 (10%) пациенток с РМЖ.

2.3.4 Анализ очагов γ -H2AX как биомаркера ответа злокачественного процесса на химиотерапию у больных раком молочной железы путем мониторинга двухцепочечных разрывов ДНК в лимфоцитах на автоматизированной системе «АКЛИДЕС»

Дизайн исследования – проспективное когортное исследование.



Рисунок 4 - Дизайн исследования. Этап 3

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 моноклеарные клетки. Анализ очагов γ -H2AX в лимфоцитах проводили с использованием набора для иммунофлуоресцентного окрашивания γ -H2AX (AKLIDES Nuk Human Lymphocyte Complete, Medipan) [168]. 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 автоматизированной системы Аклидес из Германии. Учитывая технические сложности по реализации 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 дорожественным образованием молочной железы.

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

Выделение ДНК из периферической крови

Выделение ДНК из биоматериала проводилось набором «ПРОБА–ГС-ГЕНЕТИКА» компании ТОО ДНК-Технология, предназначенном для получения ДНК с целью последующего проведения генетических исследований выделенной ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени по инструкции производителя:

«В качестве биологического материала использовалась цельная периферическая кровь. Взятие цельной периферической крови проводилось в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объемом 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл К2ЭДТА. Маркировка проводилась для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К-» по одной пробирки объёмом 1,5мл.

Подготовка смеси лизирующего раствора с сорбентом проводилась путем смешивания в отдельной пробирке:

- 150 x (N+1) мкл лизирующего раствора;
- 20 x (N+1) предварительно ресуспендированного сорбента,

где N + 1 – количество анализируемых образцов с учётом «К-» (N) с запасом на один образец. Далее добавляли в каждую пробирку по 170 мкл полученной смеси. Вносили по 100 мкл подготовленного биоматериала в пробирки для исследуемых образцов. В пробирку, маркированную «К-», вносили 100 мкл транспортной среды. Термостатировали пробирки в течение 10 мин при +50С. Центрифугировали пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин. Не задевая осадок, полностью удалили надосадочную жидкость. Добавляли к осадку 400 мкл промывочного раствора №1 и встряхивали пробирки на вортексе в течение 3–5 с. Центрифугировали пробирки при 13 000 об/мин в течение 1 мин. Не задевая осадок, полностью удаляли надосадочную жидкость. Добавляли к осадку 200 мкл промывочного раствора №2 и встряхивали пробирки на вортексе в течение 3–5 с. Центрифугировали пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин. Не задевая осадок, полностью удаляли надосадочную жидкость. Добавляли к

осадку 200 мкл промывочного раствора №3 и встряхивали пробирки на вортексе в течение 3–5 с. Центрифугировали пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин. Не задевая осадок, полностью удаляли надосадочную жидкость. Открывали крышки пробирок и высушивали осадок при +50 °С в течение 5 мин. Добавляли к осадку 100 мкл элюирующего раствора и встряхивали пробирки на вортексе в течение 5–10 с. Прогрели пробирки при +50°С в течение 5 мин. Центрифугировали пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин. Надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, готова к внесению в реакционную смесь для ПЦР–амплификации».

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени

Проведено в соответствии с стандартными инструкциями производителя: «Полимеразную цепную реакцию проводили с помощью стандартного диагностического набора реагентов ОнкоГенетика, который предназначен для определения в препаратах ДНК человека, полученных из периферической крови, аллельных вариантов генов, ассоциированных с риском развития онкопатологии, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

Принцип метода ПЦР основан на использовании процесса амплификации ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Таq–полимеразой.

В смесь для амплификации вводились сигнальные зонды, содержащие флуоресцентные метки Fam и Hex, на каждый вариант определяемого генетического полиморфизма (мутации). После окончания ПЦР проводился раунд температурного плавления дуплексов, образованных ампликонами и сигнальными зондами, в результате чего изменялся уровень флуоресценции, который фиксировался и был представлен программным обеспечением прибора в виде графика.

Промаркировали для каждого определяемого полиморфизма необходимое количество пробирок для амплификации объемом 0,2 мл: по одной пробирке – для каждого исследуемого образца, для отрицательного контрольного образца (К-), для положительных контрольных образцов «К+1 (гомозиготный по нормальному аллелю)» и «К+2 (гетерозиготный)». Внесли во все промаркированные пробирки по 20 мкл соответствующей смеси для амплификации (для каждого полиморфизма отдельным наконечником). Встряхивали пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой Таq-АТ-полимеразой в течение 3-5 с и центрифугировали в течение 1-3 с на микроцентрифуге – вортексе. Приготовили смесь ПЦР-буфера с Таq-АТ-полимеразой. Добавляли в каждую пробирку со смесью для амплификации по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с полимеразой . Внесли в пробирки для исследуемых образцов по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. Далее вносили в пробирки, маркированные «К–», по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца,

прошедшего этап выделения ДНК, и в пробирки, маркированные «К+1» и «К+2», по 5,0 мкл соответствующих положительных контрольных образцов.

Для проведения ПЦР использовали амплификатор детектирующий (ООО «НПО ДНК-Технология»), ДТпрайм М2 и программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». Регистрация сигнала флуоресценции проводилась прибором автоматически во время выполнения программы амплификации.

Детекция и учёт результатов осуществлялась амплификатором детектирующим автоматически».

Анализ фокусов γ -H2AX

Анализ очагов γ -H2AX в лимфоцитах проводили с использованием набора для иммунофлуоресцентного окрашивания γ -H2AX (AKLIDES Nuk Human Lymphocyte Complete, Medipan). Анализ γ -H2AX проводили в соответствии с инструкциями производителя.

Доводили используемые реактивы до комнатной температуры (КТ) (20 - 25 °С), 6-луночные носители объекта (А) распаковали и маркировали непосредственно перед проведением анализа. Добавляли 6 мл фракционирующего средства (С) в пробирки для разбавления проб объемом 15 мл и сверху осторожно нанесли 6 мл разбавленной пробы пациента. Центрифугировали при КТ, 1200 x г, 20 мин, без тормоза. Белую полосу периферийных мононуклеарных клеток (ПМК) осторожно снимали непосредственно под сывороткой при помощи пипетки Эппендорфа 1000 мкл и переносили в другую пробирку для разбавления проб. Разбавляли PBS буфером (В I) в соотношении 1:1 и осторожно взболтывали 3 – 4 раза. Центрифугировали суспензию (КТ, 300 x g, 10 мин, максимальный тормоз). Осторожно удаляли жидкую фракцию вакуумным насосом и центрифугировали, осторожно доводили до суспензии путем добавления 2 мл PBS буфера (В I). Центрифугировали суспензию (КТ, 250 x g, 10 мин, максимальный тормоз). Осторожно удаляли жидкую фракцию вакуумным насосом и центрифугатом осторожно доводили до суспензии путем добавления 0,5 – 1 (в зависимости от размера) мл PBS буфера (В I). Для подсчета клеток приготовленную клеточную суспензию разбавляли PBS буфером (В I) 1:10 в пробирке для микроцентрифуги. Затем полученную суспензию разбавляли клеточным красителем (J) в соотношении 1:1 и произвели подсчет клеток в 10 мкл клеточной суспензии, разбавленной красителем клеток (J), в счетной камере C-Chip. Далее необходимый для культивации посева клеток объем клеточной суспензии разбавляли PBS буфером (В I) до требуемого общего объема в стеклянной чаше и перед каждым забором, для сохранности клеток, тщательно перемешивали вручную. 14.50 мкл клеточной суспензии наносили на каждое место нанесения 6-луночного носителя объекта (А), лунка „CONTROL“ в этом шаге остается свободной. Затем носители объекта (А) накрывали и выдерживали 10 мин при комнатной температуре. Для фиксации клеток пипетировали непосредственно в суспензию очень осторожно и медленно (около 1,5 мин) 50 мкл фиксирующего раствора (I) и затем выдерживали 15 мин при комнатной температуре в закрытом

виде. После фиксации 6-луночные носители объекта (А) промывали 3 x 10 мин в PBS буфере (В I) в красильной ванне на шейкере (150 - 300 об/мин). Для пермеабиллизации клеток 6-луночный носитель объекта (А) погружали холодную красильную ванну с ледяным пермеабиллизирующим раствором (D) на 5 мин при температуре 4 °С. Затем 6-луночные носители объекта (А) промывали 3 x 10 мин в BSA / PBS буфере (В II/ В I) в красильной ванне на шейкере (150 - 300 об/мин). Помещали 6-луночные носители объекта (А) во влажную камеру и промокаем шаблоном из впитывающей бумаги (F) без контакта с поверхностью нанесения носителей объекта. Затем пипетировали на каждую лунку 25 мкл приготовленного раствора первичных антител (Е I) и в лунку „CONTROL“, инкубировали в закрытом виде 1 ч при комнатной температуре. Достали 6-луночные носители объекта (А) и промывали 3 x 10 мин в BSA / PBS буфере (В II/ В I) в красильной ванне на шейкере (150 - 300 об/мин). Затем достали 6-луночные носители объекта (А) из красильных ванн и осторожно промокали шаблоном из впитывающей бумаги (F) без контакта с поверхностью нанесения. Помещали 6-луночные носители объекта (А) во влажную камеру. Затем пипетировали на каждую лунку 25 мкл приготовленного раствора вторичных антител (Е II) и в лунку „CONTROL“, инкубировали в закрытом виде и защищенном от света месте 1 ч при комнатной температуре. Извлекали 6-луночные носители объекта (А) и промывали 3 x 10 мин в PBS буфере (В I) в красильной ванне на шейкере (150 - 300 об/мин). Затем извлекали 6-луночные носители объекта (А) из красильной ванны и осторожно промокали шаблоном из впитывающей бумаги (F) без контакта с поверхностью нанесения. В каждую лунку добавляли по небольшой капле покрывного средства (G) и помещали сверху покровное стекло (H), избегая образования воздушных пузырей. Проводился анализ 6-луночных носителей объекта (А) при помощи системы AKLIDES® Nuk.

Для каждого образца анализировали минимум 80-100 клеток и оценивали следующие параметры: в режиме FITC (маркер двухнитевых разрывов ДНК) количество посчитанных клеток, средний диаметр ядер, количество очагов γ H2AX, поврежденные клетки, общее количество очагов γ H2AX, диаметр очагов γ H2AX, среднее значение интенсивности свечения очагов γ H2AX, среднее количество очагов γ H2AX на клетку.

2.3.5 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 оценивалось 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: Для компиляции данных были рассчитаны 95% ДИ.

Поскольку исследование являлось описательным, 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.

Статистическая значимость влияния факторов на бинарную целевую переменную осуществлялась с помощью критерия Хи-квадрат Пирсона. Все показатели сортировались по убыванию значимости (статистика Хи-квадрат), и, таким образом, были отобраны ключевые факторы развития рисков события «РМЖ».

Относительный риск представляет собой отношение риска наступления определенного события у лиц, подвергшихся воздействию фактора риска, по отношению к контрольной группе (группе без воздействия фактора). Относительный риск равный 1 значит, что нет разницы в риске между двумя группами. Относительный риск < 1 значит, что в экспериментальной группе событие развивается реже чем в контрольной. Относительный риск > 1 значит, что в экспериментальной группе событие развивается чаще чем в контрольной.

Для анализа качества смоделированных деревьев применялся ROC-анализ.

Прогностическая оценка выявленных рисков полиморфизмов в качестве предиктора возникновения РМЖ проведена с помощью ROC-анализа (receiver operating characteristic) в координатах графиков «чувствительность–специфичность» с вычислением AUC (area under ROC curve) – площади под ROC-кривой и точки отсечения (cut-off value) – значения оптимального порога отсечения переменной. При проверке статистических гипотез значения $P < 0,05$ считались как статистически значимые.

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.

Прогностическая оценка анализа очагов γ -H2AX в качестве предиктора эффективности химиотерапии проведена с помощью ROC-анализа (receiver operating characteristic) в координатах графиков «чувствительность–специфичность» с вычислением AUC (area under ROC curve) – площади под ROC-кривой и точки отсечения (cut-off value) – значения оптимального порога отсечения переменной. При проверке статистических гипотез значения $P < 0,05$ считались как статистически значимые.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью пакетов прикладных программ Statistica 10 и SAS JMP 11.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Эпидемиология рака молочной железы в 2014-2018гг. и 2022г. в Актыбинской области

При анализе ЭРОБ в период с 2014 по 2018 гг. зарегистрирован 891 новый случай РМЖ в Актыбинской области [169]. В 2022 году зарегистрировано 192 новых случаев РМЖ. Подробная информация по всем независимым переменным представлена в таблице 3. Пятилетняя выживаемость за период исследования составила 51,6% (95%ДИ: 50,45-52,89). В 2022г. 5-летняя выживаемость составила 55,09%.

Смертность от РМЖ в 2022 году по данным ЭРОБ составила 41 случаев.

Таблица 3 - Число новых случаев РМЖ с 95% доверительным интервалом в Актыбинской области в 2014-2018 гг. и 2022г.

Характеристика	Н случай (95%ДИ) 2014-2018 гг.	Н случай (95%ДИ) 2022г.
	891	192
Этническая принадлежность		
Казашки	591 (65.54-71.74)	129 (10.04-20.17)
Другие	270 (28.26-34.46)	63 (26.17-39.45)
Статус занятости		
Пенсионер	364 (38.98-45.58)	81 (35.20-49.17)
Безработные	108 (10.33-14.76)	27 (9.15-18.98)
Работающие	386 (41.51-48.15)	85 (37.24-51.30)
Инвалид 2 гр	3 (-0.05-0.74)	1 (-0.50-1.54)
Место жительства		
Городские	545 (60.08-66.52)	119 (55.11-68.85)
Сельские	316 (33.48-39.92)	73 (31.15-44.89)
Гистологический тип		
Неинвазивный рак (in situ)		
Внутрипротоковый рак in situ	8 (0.29-1.57)	-
Дольковый рак in situ	3 (-0.05-0.74)	-
Инвазивный рак (инфильтрирующая карцинома)		
Протоковая карцинома	763 (86.50-90.74)	173 (85.88-94.33)
Дольковая карцинома	23 (1.59-3.75)	3 (-0.19-3.32)
Другие типы	64 (5.68-9.19)	15 (4.02-11.61)
Стадия		
I	193 (19.63-25.20)	46 (17.92-30.00)
II	585 (64.83-71.06)	122 (56.73-70.35)
III	68 (6.10-9.70)	18 (5.25-13.50)
IV	15 (0.87-2.62)	8 (1.34-6.99)

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 2020г. (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 (рисунок 5). При этом темп прироста составляет 1,6%.



Рисунок 5 - Анализ динамики заболеваемости впервые выявленных РМЖ в Актыбинской области

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 (рисунок б).



Рисунок б – Анализ динамики общей заболеваемости РМЖ в Актыбинской области

Мы выявили тенденцию роста по заболеваемости и распространенности РМЖ. Поскольку это самая распространенная онкологическая заболеваемость у женщин Актюбинской области с низкой 5-летней выживаемостью, для нас представлял интерес – изучить генетический профиль больных РМЖ. Поэтому следующим этапом нашего исследования было выявление распространенности полиморфизмов генов BRCA 1, BRCA 2 методом ПЦР у больных РМЖ Актюбинской области.

3.1.1 Распространенность полиморфизмов генов BRCA 1, BRCA 2 у больных раком молочной железы (Этап А)

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 [170]. 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) (таблица 4).

Таблица 4 - Обнаруженные мутации BRCA 1, BRCA 2 у больных с раком молочной железы

Вариант	N (278)	%, (95% ДИ)
BRCA 1		
5382insC	2	0,72 % (95% ДИ 0.27-1.71)
300T>G (Cys61Gly)	1	0,36% (95% ДИ 0.34-1.06)

Пациентка А, 29 лет, раса азиатская (казашка), выявлена мутация в гене BRCA1 5382insC. Диагноз: Карцинома левой молочной железы STIIAрT2N2M0. Состояние после комплексного лечения (4 курса нео-ПХТ+двухсторонняя радикальная мастэктомия+ЛТ). Наследственный анамнез отягощен. Родная старшая сестра умерла от рака яичников в возрасте 43 лет. Отец умер от рака легкого в возрасте 51 год.

Учитывая семейный анамнез пациентке было выполнено медико-генетическое консультирование. Методом аллель-специфической ПЦР (Тип ДТпрайм-4M1; ООО «НПО ДНК-Технология») проведено генетическое исследование на определение статуса BRCA1 (мутации 185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 300T>G (Cys61Gly), 2080delA) и BRCA2 (мутация 6174delT). Заключение: при исследовании образца ДНК обнаружено: гетерозиготная замена в гене BRCA1 мутация 5382insC. Учитывая наличие у пациентки мутации (5382insC), семейный анамнез, проведена работа по медико-генетическому консультированию родственников (мать, брат, сестры и их совершеннолетние дети). По результату анализа нами выявлена аналогичная мутация 5382insC у родного старшего брата (42 лет) и его родной дочери (17 лет), родной второй старшей сестры (37 лет). Нами была составлена родословная [171].

Старшая родная сестра Ж. 1975г.р. В октябре 2015г. диагностирована Карцинома яичников STIIT3N1M0. В ноябре 2018г. проведено молекулярно-генетическое исследование мутации генов BRCA1, BRCA2. Заключение: в исследуемом образце в 20 экзоне гена BRCA1 обнаружена мутация 5382insC в гетерозиготном состоянии. Несмотря, на проведенное лечение, терапия была безуспешной, пациентка умерла в возрасте 43 лет.

Родная вторая старшая сестра А. 1981г.р. Обнаружена BRCA1 мутация 5382insC. В данный момент имеется жалоба на образование в левой молочной железе. Обследована. По данным маммографии – BI-RADS M2-L2, УЗИ молочных желез - образование левой молочной железы, размером 1.5-2 см. Произведено пункция образования, результат цитологии без атипии. УЗИ малого таза - без патологии. Пациентка находится под наблюдением у онкологов.

Старший родной брат – Г. 1976г.р. Обнаружен BRCA1 мутация 5382insC. На момент обследования жалоб не предъявляет. Онкомаркер PSA- 0.3нг\мл. МРТ предстательной железы – МРТ картина характерна для узлообразования правой доли предстательной железы. Пациент находится под наблюдением.

Племянница (дочь брата) – 2002 г.р. проведено аналогичное исследование в январе 2019г. Обнаружена BRCA1 мутация 5382insC. Обследована. По данным УЗИ малого таза без структурных изменений. УЗИ молочных желез - в правой молочной железе верхнем наружном квадранте гипоехогенное образование 2,0x1,2 см, аналогичное в левой молочной железе 2,9x1,9см. Фиброаденомы обеих молочных желез. Проведена пункция образования молочных желез. Результат цитологии – атипия не выявлена. Пациентка продолжает находиться под наблюдением.

Родословная построена со слов пациентки, при этом определить генетический статус у умерших предков не представлялся возможным (рисунок 7).

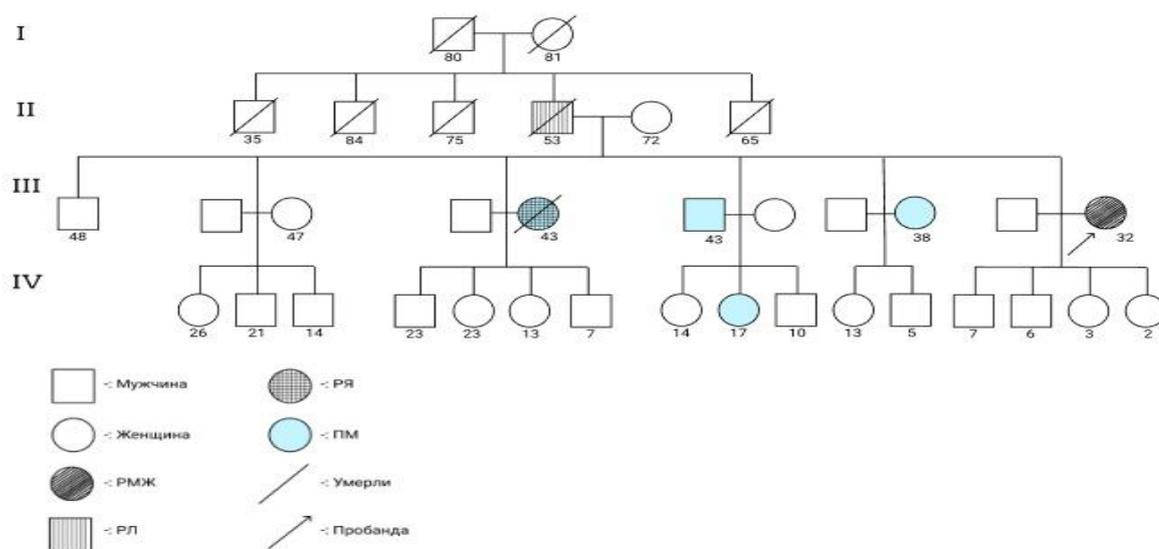


Рисунок 7 - Родословная пациентки А

Мы выявили только 3 случая семейного рака с подтвержденными полиморфизмом гена BRCA1. Причем, наиболее часто встречаемая в мире мутация 5382insC гена BRCA1 обнаружена только у двоих пациенток (0,72%). Возможно низкая частота выявления полиморфизмов связана с использованием стандартных диагностических панелей тестирования мутации генов. Поэтому для углубленного изучения полиморфизма генов мы продолжили исследования генетического профиля путем проведения анализа 113 кандидатных генов с использованием технологии NGS (Next generation sequencing, Illumina) секвенирования у женщин казашек с раком молочной железы в Актюбинской области.

3.1.2 Результаты NGS секвенирования и биоинформационного анализа генов у больных 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 участках по данным GWAS исследования.

Результаты данных о локализации 113 полиморфизмов в хромосомах (номер хромосомы и позиция в ней) и референтное значение аллелей в популяции представлены в приложении А. По данным проведенного анализа качества генотипирования выявлено, что около 1,22% результатов имеют пропуски (Missing in genotyping).

Графическое изображение качества генотипирования, выполненного на собственном материале у больных с РМЖ, представлено рисунком 8, и группе контроля рисунком 9.

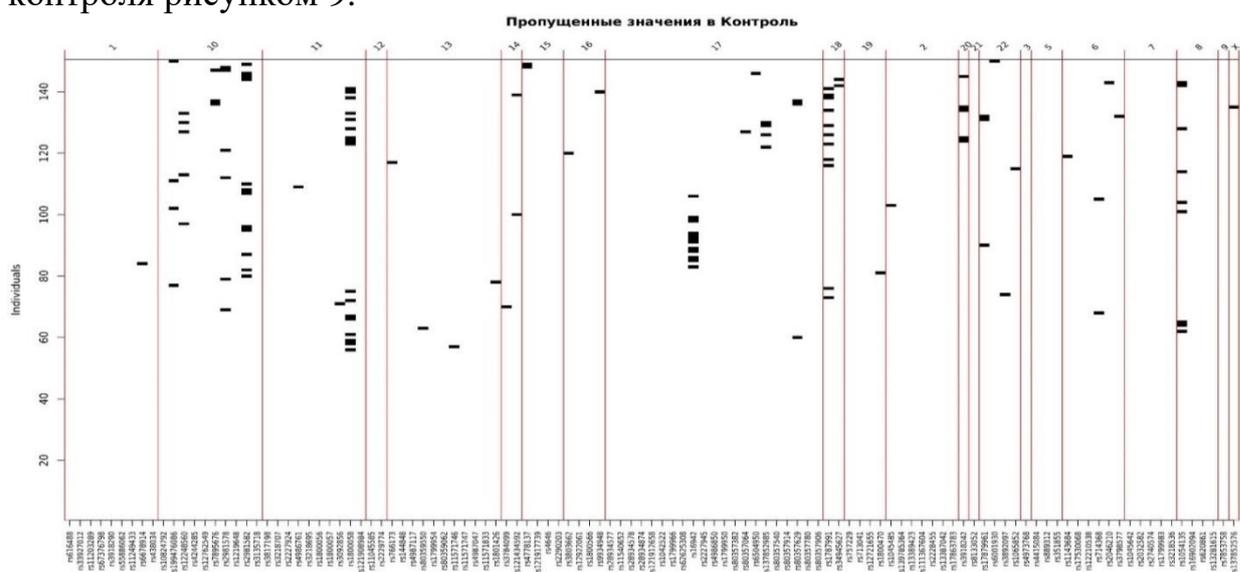


Рисунок 8 - Графическое представление генотипирования группы контроля

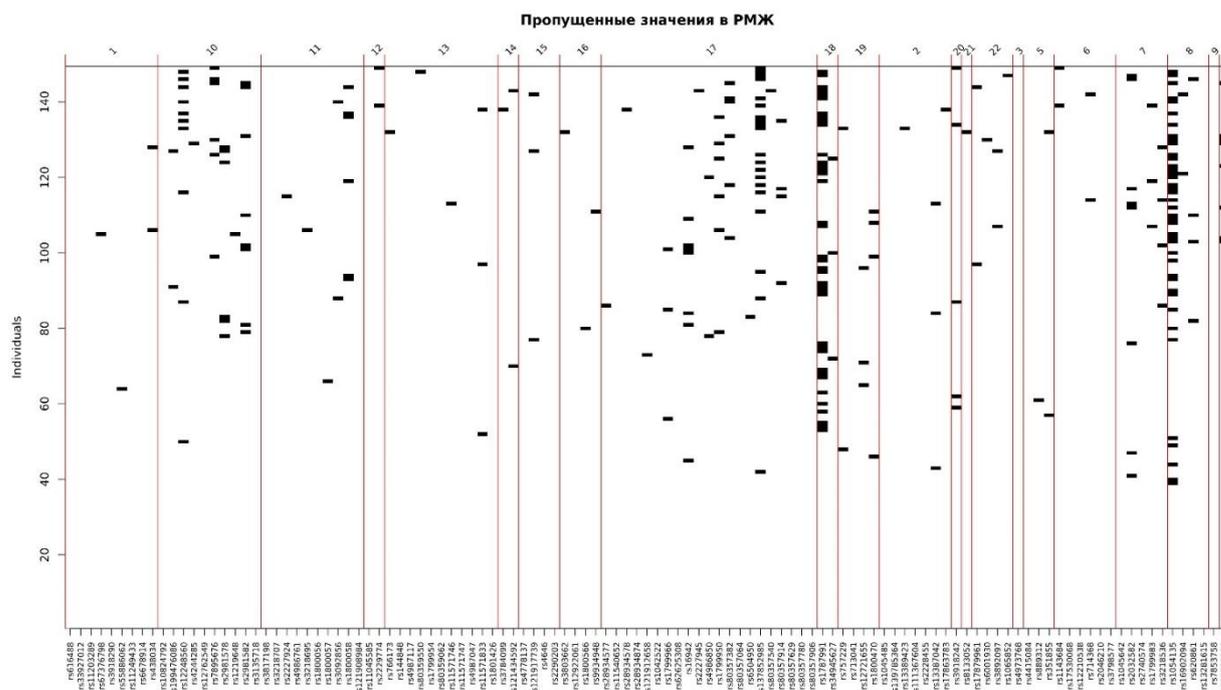


Рисунок 9 - Графическое представления генотипирования группы РМЖ

В результате статистического анализа собственных данных, были получены результаты в виде абсолютных и относительных значений аллелей и генотипов у пациенток с РМЖ и контрольной группой, а также значение p -value ($p < 0,05$) на соответствие равновесного распределения Харди-Вайнберга и представлены в приложении Б.

Мы провели сравнительный анализ различий аллелей и генотипов у больных РМЖ и контрольной группы. Выявили 28 статистически значимых полиморфизмов, ассоциированных с раком молочной железы, которые представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Сравнительная оценка различий аллелей и генотипов у больных РМЖ и контрольной группы

№	Показатель	Генотип	Группа исследования (n)		Всего	Уровень P, (df=1)
1	2	3	4	5	6	7
1	Rs55886062		РМЖ (N=148)	Контрольная группа (N=150)		0,0093
		AA	108 (72,97%)	88 (58,67%)	196	
		AC	40 (27,03%)	62 (41,33%)	102	
2	Rs3918290		РМЖ (N=149)	Контрольная группа (N=150)	Всего	Уровень P, (df=1)
		CC	109 (73,15%)	88 (58,67%)	197	0,0082
		CT	40 (26,85%)	62 (41,33%)	102	
3	Rs12721655		РМЖ (N=146)	Контрольная группа (N=150)	Всего	Уровень P, (df=1)

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6	7
		AA	106 (72,60%)	88 (58,67%)	194	0,0117
		AG	40 (27,40%)	62 (41,33%)	102	
4	Rs4987117		PMЖ (N=149)	Контрольная группа (N=150)	Всего	Уровень P, (df=1)
		CC	109 (73,15%)	86 (57,33%)	195	0,0041
		CT	40 (26,85%)	64 (42,67%)	104	
5	Rs2229774		PMЖ (N=147)	Контрольная группа (N=150)	Всего	Уровень P, (df=2)
		GG	40 (27,21%)	131 (87,33%)	171	<0,0001
		AG	107 (72,79%)	18 (12,00%)	125	
		AA	(0,00%)	1 (0,67%)	1	
6	Rs11203289		PMЖ (N=149)	Контрольная группа (N=150)	Всего	Уровень P, (df=1)
		GG	109 (73,15%)	88 (58,67%)	197	0,0082
		GC	40 (26,85%)	62 (41,33%)	102	
7	Rs16942		PMЖ (N=141)	Контрольная группа (N=138)	Всего	Уровень P, (df=2)
		CT	75 (53,19%)	94 (68,12%)	169	0,0102
		TT	62 (43,97%)	44 (31,88%)	106	
		CC	4 (2,84%)	(0,00%)	4	
8	Rs34945627		PMЖ (N=146)	Контрольная группа (N=148)	Всего	Уровень P, (df=1)
		CC	107 (73,29%)	87 (58,78%)	194	0,0087
		CT	39 (26,71%)	61 (41,22%)	100	
9	Rs11571747		PMЖ (N=149)	Контрольная группа (N=150)	Всего	Уровень P, (df=1)
		AA	109 (73,15%)	88 (58,67%)	197	0,0082
		AC	40 (26,85%)	62 (41,33%)	102	
10	Rs137852576		PMЖ (N=141)	Контрольная группа (N=149)	Всего	Уровень P, (df=1)
		AG	107 (75,89%)	87 (58,39%)	194	0,0016
		GG	34 (24,11%)	62 (41,61%)	96	
11	Rs11571833		PMЖ (N=146)	Контрольная группа (N=150)	Всего	Уровень P, (df=1)
		AA	105 (71,92%)	88 (58,67%)	193	0,0167
		AT	41 (28,08%)	62 (41,33%)	103	
12	Rs80359062		PMЖ (N=149)	Контрольная группа (N=150)	Всего	Уровень P, (df=1)
		CC	109 (73,15%)	88 (58,67%)	197	0,0082
		CG	40 (26,85%)	62 (41,33%)	102	
13	Rs3218536		PMЖ (N=145)	Контрольная группа (N=150)	Всего	Уровень P, (df=1)
		CC	98 (67,59%)	80 (53,33%)	178	0,0124
		CT	47 (32,41%)	70 (46,67%)	117	
14	Rs80357382		PMЖ (N=143)	Контрольная группа (N=150)	Всего	Уровень P, (df=1)

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6	7
		ТТ	105 (73,43%)	88 (58,67%)	193	0,0077
		ТС	38 (26,57%)	62 (41,33%)	100	
15	Rs28934577		РМЖ (N=148)	Контрольная группа (N=150)	Всего	Уровень P, (df=1)
		АА	108 (72,97%)	88 (58,67%)	196	0,0093
		АТ	40 (27,03%)	62 (41,33%)	102	
16	Rs2981582		РМЖ (N=141)	Контрольная группа (N=138)	Всего	Уровень P, (df=2)
		АГ	104 (73,76%)	44 (31,88%)	148	<0,0001
		ГГ	10 (7,09%)	81 (58,70%)	91	
		АА	27 (19,15%)	13 (9,42%)	40	
17	Rs137852985		РМЖ (N=129)	Контрольная группа (N=146)	Всего	Уровень P, (df=2)
		СС	33 (25,58%)	136 (93,15%)	169	<0,0001
		ТС	91 (70,54%)	7 (4,79%)	98	
		ТТ	5 (3,88%)	3 (2,05%)	8	
18	Rs1800057		РМЖ (N=148)	Контрольная группа (N=150)	Всего	Уровень P, (df=1)
		СС	108 (72,97%)	88 (58,67%)	196	0,0093
		СГ	40 (27,03%)	62 (41,33%)	102	
19	Rs3092856		РМЖ (N=147)	Контрольная группа (N=149)	Всего	Уровень P, (df=1)
		СС	107 (72,79%)	87 (58,39%)	194	0,0091
		СТ	40 (27,21%)	62 (41,61%)	102	
20	Rs1800058		РМЖ (N=143)	Контрольная группа (N=133)	Всего	Уровень P, (df=2)
		СС	97 (67,83%)	63 (47,37%)	160	0,0022
		СТ	45 (31,47%)	67 (50,38%)	112	
		ТТ	1 (0,70%)	3 (2,26%)	4	
21	Rs1799950		РМЖ (N=143)	Контрольная группа (N=150)	Всего	Уровень P, (df=1)
		ТТ	129 (90,21%)	146 (97,33%)	275	0,0111
		СТ	14 (9,79%)	4 (2,67%)	18	
22	Rs1799954		РМЖ (N=149)	Контрольная группа (N=150)	Всего	Уровень P, (df=1)
		СС	109 (73,15%)	87 (58,00%)	196	0,0058
		СТ	40 (26,85%)	63 (42,00%)	103	
23	Rs889312		РМЖ (N=148)	Контрольная группа (N=150)	Всего	Уровень P, (df=2)
		АС	83 (56,08%)	86 (57,33%)	169	0,0131
		АА	28 (18,92%)	44 (29,33%)	72	
		СС	37 (25,00%)	20 (13,33%)	57	
24	Rs1787991		РМЖ (N=111)	Контрольная группа (N=139)	Всего	Уровень P, (df=2)
		ГГ	75 (67,57%)	74 (53,24%)	149	0,0308
		ГТ	35 (31,53%)	65 (46,76%)	100	
		ТТ	1 (0,90%)	(0,00%)	1	

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6	7
25	Rs3918242		PMЖ (N=144)	Контрольная группа (N=145)	Всего	Уровень P, (df=1)
		TT	90 (62,50%)	73 (50,34%)	163	0,0372
		TC	54 (37,50%)	72 (49,66%)	126	
26	Rs62625308		PMЖ (N=149)	Контрольная группа (N=150)	Всего	Уровень P, (df=1)
		GG	109 (73,15%)	88 (58,67%)	197	0,0082
		GA	40 (26,85%)	62 (41,33%)	102	
27	Rs757229		PMЖ (N=147)	Контрольная группа (N=150)	Всего	Уровень P, (df=2)
		GC	72 (48,98%)	37 (24,67%)	109	<0,0001
		CC	51 (34,69%)	52 (34,67%)	103	
		GG	24 (16,33%)	61 (40,67%)	85	
28	Rs7895676		PMЖ (N=143)	Контрольная группа (N=147)	Всего	Уровень P, (df=1)
		TT	91 (63,64%)	75 (51,02%)	166	0,0299
		TC	52 (36,36%)	72 (48,98%)	124	

При проведении анализа 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 по данным других исследователей. GWAS каталог позволил определить 7 рисковых статистически значимых полиморфизмов: RARG (Rs2229774), FGFR2 (Rs2981582), ATM (Rs1800057), MAP3K1 (Rs889312), BRCA2 (Rs11571833), FGFR2 (Rs7895676), FGFR2 (Rs1219648).

Далее мы оценили влияние генетических моделей наследования на риск развития РМЖ. Так как выявлены различные уровни статистической значимости в различиях как аллелей, так и генотипов, мы провели оценку генотип-фенотип связи с учетом различных моделей наследования. Расчеты произведены с учетом того факта, что референтным (не рисковым) аллелем прежде всего может быть мажорный аллель (что справедливо в большинстве случаев), но и, возможно, минорный аллель. Поэтому проведен анализ для обоих вариантов. Оценка проводилась в соответствии с дизайном случай-контроль на основе обобщенной линейной модели (GLM - generalized linear model).

Мы исследовали генотипическую связь (генотип-фенотип) между 28 (SNP) однонуклеотидными полиморфизмами и риском развития РМЖ по пяти генетическим моделям (кодоминантная, доминантная, рецессивная, сверхдоминантная и лог-аддитивная модели).

Для каждого полиморфизма рассчитаны две вариации «генотип-фенотип» (либо common, либо minor). Это обусловлено тем, что необходимо было определить какой аллель является рисковым, т.е. связан с риском развития заболеваний. Расчеты «по-умолчанию» (группа - common) подразумевают, что

минорные аллели являются рисковыми. Мы ожидали, что в большинстве случаев это является истиной. Тем не менее для исключения ситуации, когда рисковый аллель является мажорным для популяции, а минорный аллель является референсным, мы проанализировали расчеты в группе «minor».

В приложении В представлены расчеты ассоциативных связей генотип-фенотип по двум вариациям common и minor генов с риском развития РМЖ.

В результате анализа выявлено, что генотипы A/G и A/A rs2981582 гена FGFR2 повышает шансы развития РМЖ в 19.15 и 16.82 раза (кодоминантная модель), соответственно; объединение генотипов A/G-A/A rs2981582 гена FGFR2 повышает шансы развития РМЖ в 18.62 раз (доминантная модель), вариантный гомозиготный генотип A/A rs2981582 гена FGFR2 повышает шансы развития РМЖ в 2.28 раз (рецессивная модель), гетерозиготный генотип A/G rs2981582 гена FGFR2 повышает шансы развития РМЖ в 6 раз (сверхдоминантная модель). Таким образом полиморфизм rs2981582 гена FGFR2 увеличивает шансы развития РМЖ по 4 моделям наследования.

Генотип A/G rs2229774 гена RARG повышает шансы развития РМЖ в 19.47 раз (кодоминантная модель), генотипы A/G-A/A повышает шансы развития РМЖ в 18.44 раз (доминантная модель), генотип A/G повышает шансы развития РМЖ в 19.62 раз (сверхдоминантная модель). Полиморфизм rs2229774 гена RARG увеличивает шансы развития РМЖ по 3 моделям наследования.

Генотипы A/C-C/C rs889312 гена MAP3K1 повышает шансы развития РМЖ в 1.78 раз (доминантная модель), генотип C/C повышает шансы развития РМЖ в 2.17 раз (рецессивная модель). Полиморфизм rs889312 гена MAP3K1 повышает шансы развития РМЖ по 2 моделям наследования.

Генотип T/C rs137852985 гена BRIP1 повышает шансы развития РМЖ в 53.58 раз (кодоминантная модель), генотипы T/C-T/T повышает шансы развития РМЖ в 39.56 раз (доминантная модель), генотип T/C повышает шансы развития РМЖ 24.41 раз (сверхдоминантная модель), генотип T/C увеличивает шансы развития РМЖ 47.55 раз. 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 (кодоминантная модель).

Однофакторное прогнозирование риска развития РМЖ по возрасту и полиморфизму генов, ассоциированных с раком молочной железы

Представлялось важным определить прогностические факторы риска развития РМЖ. В данном разделе представлены результаты статистического однофакторного прогнозирования риска развития РМЖ по возрасту и полиморфизму генов, ассоциированных с раком молочной железы для количественных и бинарных факторов. Статистическая значимость влияния факторов на бинарную целевую переменную осуществлялась с помощью критерия Хи-квадрат Пирсона. Все показатели сортировались по убыванию значимости и, таким образом, были отобраны ключевые факторы развития рисков события «РМЖ».

В таблице 6 представлен список ТОП-32 факторов риска по отношению к целевой переменной «РМЖ».

Таблица 6 - ТОП-32 ключевых факторов влияния на целевой показатель «РМЖ» (оценки абсолютных рисков, изменение риска, относительный риск)

Фактор	РМЖ: частота (риск, %)		Изменение риска (95% ДИ)	Относительн ый риск (95% ДИ)	Урове нь Р
	Фактор: Нет	Фактор: Есть			
1	2	3	4	5	6
Rs137852985 (ТС, ТТ)		96 (90,6%)	71,0 (62,9; 79,2)%	33 (19,5%)	<0,000 1
Rs2229774 (AG, AA)	40 (23,4%)	107 (84,9%)	61,5 (52,6; 70,4)%	3,63 (2,74; 4,81)	<0,000 1
Rs2981582 (AG, AA)	10 (11,0%)	131 (69,7%)	58,7 (49,5; 67,9)%	6,34 (3,51; 11,47)	<0,000 1
Rs757229 (GC, CC)	24 (28,2%)	123 (58,0%)	29,8 (18,1; 41,4)%	2,05 (1,44; 2,94)	<0,000 1
Возраст, лет \geq 54,0	52 (36,9%)	96 (61,1%)	24,3 (13,2; 35,3)%	1,66 (1,29; 2,13)	<0,000 1
Rs1800058 (CC)	46 (39,7%)	97 (60,6%)	21,0 (9,3; 32,7)%	1,53 (1,18; 1,98)	0,0006
Rs137852576 (AG)	34 (35,4%)	107 (55,2%)	19,7 (7,9; 31,6)%	1,56 (1,16; 2,10)	0,0016
Rs4987117 (CC)	40 (38,5%)	109 (55,9%)	17,4 (5,8; 29,1)%	1,45 (1,11; 1,91)	0,0041
Rs1799954 (CC)	40 (38,8%)	109 (55,6%)	16,8 (5,1; 28,5)%	1,43 (1,09; 1,88)	0,0058
Rs80357382 (ТТ)	38 (38,0%)	105 (54,4%)	16,4 (4,6; 28,2)%	1,43 (1,08; 1,90)	0,0077
Rs3918290 (CC)	40 (39,2%)	109 (55,3%)	16,1 (4,4; 27,9)%	1,41 (1,07; 1,85)	0,0082
Rs11203289 (GG)	40 (39,2%)	109 (55,3%)	16,1 (4,4; 27,9)%	1,41 (1,07; 1,85)	0,0082
Rs11571747 (AA)	40 (39,2%)	109 (55,3%)	16,1 (4,4; 27,9)%	1,41 (1,07; 1,85)	0,0082
Rs80359062 (CC)	40 (39,2%)	109 (55,3%)	16,1 (4,4; 27,9)%	1,41 (1,07; 1,85)	0,0082
Rs62625308 (GG)	40 (39,2%)	109 (55,3%)	16,1 (4,4; 27,9)%	1,41 (1,07; 1,85)	0,0082
Rs34945627 (CC)	39 (39,0%)	107 (55,2%)	16,2 (4,3; 28,0)%	1,41 (1,07; 1,86)	0,0087
Rs3092856 (CC)	40 (39,2%)	107 (55,2%)	15,9 (4,2; 27,7)%	1,41 (1,07; 1,85)	0,0091
Rs55886062 (AA)	40 (39,2%)	108 (55,1%)	15,9 (4,1; 27,6)%	1,41 (1,07; 1,85)	0,0093
Rs28934577 (AA)	40 (39,2%)	108 (55,1%)	15,9 (4,1; 27,6)%	1,41 (1,07; 1,85)	0,0093

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5	6
Rs1800057 (CC)	40 (39,2%)	108 (55,1%)	15,9 (4,1; 27,6)%	1,41 (1,07; 1,85)	0,0093
Rs889312 (CC)	111 (46,1%)	37 (64,9%)	18,9 (5,0; 32,8)%	1,41 (1,11; 1,78)	0,0105
Rs1799950 (CT)	129 (46,9%)	14 (77,8%)	30,9 (10,8; 51,0)%	1,66 (1,26; 2,19)	0,0111
Rs12721655 (AA)	40 (39,2%)	106 (54,6%)	15,4 (3,6; 27,2)%	1,39 (1,06; 1,83)	0,0117
Rs3218536 (CC)	47 (40,2%)	98 (55,1%)	14,9 (3,4; 26,4)%	1,37 (1,06; 1,77)	0,0124
Rs1787991 (GG, TT)	35 (35,0%)	76 (50,7%)	15,7 (3,4; 28,0)%	1,45 (1,06; 1,97)	0,0146
Rs11571833 (AA)	41 (39,8%)	105 (54,4%)	14,6 (2,8; 26,4)%	1,37 (1,04; 1,79)	0,0167
Rs7895676 (TT)	52 (41,9%)	91 (54,8%)	12,9 (1,4; 24,4)%	1,31 (1,02; 1,68)	0,0299
Rs3918242 (TT)	54 (42,9%)	90 (55,2%)	12,4 (0,8; 23,9)%	1,29 (1,01; 1,65)	0,0372
Rs16942 (TT)	79 (45,7%)	62 (58,5%)	12,8 (0,9; 24,8)%	1,28 (1,02; 1,61)	0,0375
Rs12762549 (CG, GG)	25 (38,5%)	124 (53,0%)	14,5 (1,1; 28,0)%	1,38 (0,99; 1,92)	0,0382
Rs1800470 (TT, CC)	63 (43,4%)	82 (55,0%)	11,6 (0,2; 22,9)%	1,27 (1,00; 1,60)	0,0470
Rs1219648 (GG)	119 (47,2%)	29 (63,0%)	15,8 (0,6; 31,1)%	1,34 (1,03; 1,73)	0,0484
Rs8133052 (AA)	102 (46,4%)	46 (59,0%)	12,6 (-0,1; 25,4)%	1,27 (1,01; 1,61)	0,0556
Rs144848 (AA, CC)	44 (42,7%)	105 (53,6%)	10,9 (-1,0; 22,7)%	1,25 (0,97; 1,62)	0,0745
Rs3798577 (CT)	65 (45,1%)	84 (54,5%)	9,4 (-1,9; 20,7)%	1,21 (0,96; 1,52)	0,1046
Rs1045642 (AA)	113 (47,5%)	36 (59,0%)	11,5 (-2,3; 25,4)%	1,24 (0,97; 1,59)	0,1079
Rs1054135 (CC, TT)	39 (37,5%)	69 (47,6%)	10,1 (-2,3; 22,4)%	1,27 (0,94; 1,72)	0,1132
Rs4415084 (CT)	42 (43,8%)	107 (52,7%)	9,0 (-3,1; 21,0)%	1,2 (0,93; 1,56)	0,1480
Rs3892097 (TT)	145 (49,3%)	2 (100,0%)	50,7 (45,0; 56,4)%	2,03 (1,81; 2,28)	0,1531
HCV30585831 (AT)	146 (49,3%)	2 (100,0%)	50,7 (45,0; 56,4)%	2,03 (1,81; 2,28)	0,1531

По данным таблицы 6 из 40 представленных фактора 32 имеют статистически значимое влияние на целевую переменную «РМЖ» с диапазоном уровней рисков от 50,7% до 90,6%. Из списка ТОП-32 риски развития «РМЖ» увеличиваются от 47,6% до 100,0%. Наиболее 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%.

При проведении однофакторного анализа рисков целевого показателя «РМЖ» выявлено, что тремя ключевыми статистически значимыми факторами риска развития РМЖ являются полиморфизмы: «Rs137852985 (TC, TT)», «Rs2229774 (AG, AA)» и «Rs2981582 (AG, AA)» с уровнями абсолютного риска развития РМЖ более 69,7%. Наличие одного из трех ключевых факторов повышает уровень риска развития РМЖ более чем в 3,6 раза.

Разработка прогностической модели риск развития рака молочной железы

Создание прогностической модели риска развития РМЖ позволит оптимизировать диагностику данного заболевания на всех уровнях оказания медицинской помощи, с выявлением групп риска. Поэтому всех пациенток разделили на несколько рискованных классов развития целевого события (РМЖ) с помощью комбинации влияющих факторов и, затем ранжировали классы по уровню риска. Для повышения качества прогноза мы применяли метод деревьев классификации (Дерево решения). Главным преимуществом данного подхода является то, что он может обрабатывать как количественные, так и номинальные переменные, а также позволяет дать интуитивно-понятную интерпретацию каждого рискованного класса с оценкой риска и размера класса. Для построения модели риска развития РМЖ мы рассчитывали прогностическую ценность выявленных нами рискованных полиморфизмов генов и возрастной характеристики пациентов.

Для исследования прогностической ценности полученных методов и оценки качества модели дерева решений использовали такие характеристики, как AuROC, чувствительность и специфичность. При этом AuROC это площадь, под ROC-кривой. Чем выше показатель AuROC, тем качественнее классификатор, при этом значение $\leq 0,5$ показывает неприменимость выбранного метода классификации, соответствуя методу случайного гадания. Если значение AuROC меньше 0,75, то прогнозные качества дерева на низком уровне, при значениях меньше 0,85 – прогнозные качества на среднем уровне и значения выше 0,85 говорят о высоком прогнозном качестве модели. Чувствительность представляет собой долю истинноположительных результатов среди всех положительных, а специфичность, напротив, долю истинноотрицательных результатов среди всех отрицательных.

Прогностическая оценка выявленных рискованных полиморфизмов в качестве предиктора возникновения РМЖ проведена с помощью ROC-анализа (receiver operating characteristic) в координатах графиков «чувствительность–специфичность» с вычислением AUC (area under ROC curve) – площади под ROC-кривой и точки отсечения (cut-off value) – значения оптимального порога

отсечения переменной [172]. При проверке статистических гипотез значения $P < 0,05$ считались как статистически значимые.

На рисунке 10 изображена диаграмма дерева решений для показателя «РМЖ» на основе комбинации пяти влияющих факторов: «Rs137852985», «Rs757229», «Rs2981582», «Возраст, лет $< 56,0$ » и «Возраст, лет $\geq 49,0$ ».

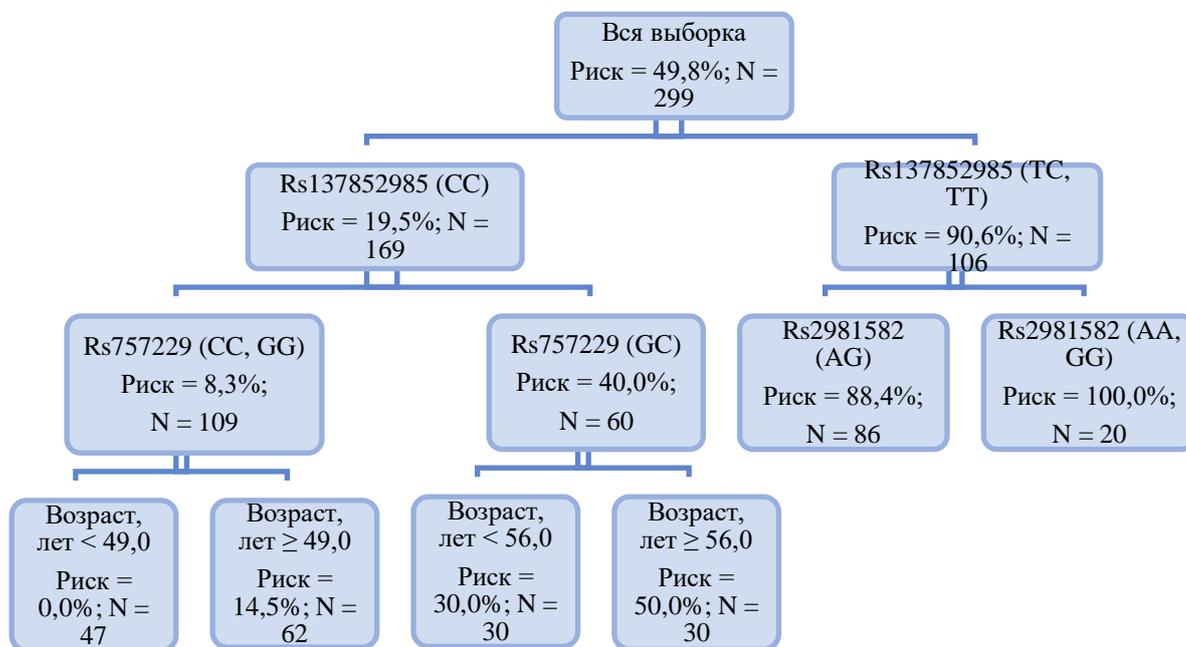


Рисунок 10 - Дерево классификации для показателя «РМЖ»

Всего с помощью дерева-решений было выделено 6 рисковых классов (таблица 7). Наиболее высокий риск развития РМЖ (Риск = 100,0%, Объем группы = 20) наблюдается у пациентов со следующей комбинацией факторов: «Rs137852985 (TC, TT)» и «Rs2981582 (AA, GG)». Наименьший уровень риска развития РМЖ (Риск = 0,0%, Объем группы = 47) наблюдается для следующей комбинации факторов: «Rs137852985 (CC)», «Rs757229 (CC, GG)» и «Возраст, лет $< 49,0$ ». Самым крупным классом с объемом группы в 86 наблюдений и уровнем риска в 88,4% является следующая комбинация факторов: «Rs137852985 (TC, TT)» и «Rs2981582 (AG)».

Таблица 7 - Отсортированные рисковые классы пациентов для целевого показателя «РМЖ» по убыванию риска

Определение класса	Объем группы	Доля класса, %	Риск, %
1	2	3	4
Rs137852985 (TC, TT) & Rs2981582 (AA, GG)	20	7,3%	100,0%
Rs137852985 (TC, TT) & Rs2981582 (AG)	86	31,3%	88,4%
Rs137852985 (CC) & Rs757229 (GC) & Возраст, лет $\geq 56,0$	30	10,9%	50,0%

Продолжение таблицы 7

1	2	3	4
Rs137852985 (CC) & Rs757229 (GC) & Возраст, лет < 56,0	30	10,9%	30,0%
Rs137852985 (CC) & Rs757229 (CC, GG) & Возраст, лет \geq 49,0	62	22,5%	14,5%
Rs137852985 (CC) & Rs757229 (CC, GG) & Возраст, лет < 49,0	47	17,1%	0,0%

Ниже приведены результаты ROC-анализа и прогнозные показатели качества построенного дерева-решений для целевого показателя «РМЖ» (рисунок 11 и таблица 8). Точка отсечения представляет собой оптимальную границу отделения положительного прогноза от отрицательного.

В таблице 8 приведены результаты ROC анализа и определения AuC с оценкой чувствительности и специфичности изученных показателей в качестве предикторов риска развития РМЖ. Установлено, что «высокое» качество прогноза высокого риска РМЖ имели факторы: «Rs137852985 (TC, TT)» и «Rs2981582 (AA, GG)», так как значение AuROC равной 0,95 свидетельствует о высоком прогнозном качестве данного смоделированного дерева-решений. Учитывая точку отсечения \geq 50,0%, следует считать, что при чувствительности в 86,0% случаях мы будем правильно идентифицировать положительный результат и при специфичности в 92,4% случаях – правильно идентифицировать отрицательный результат.

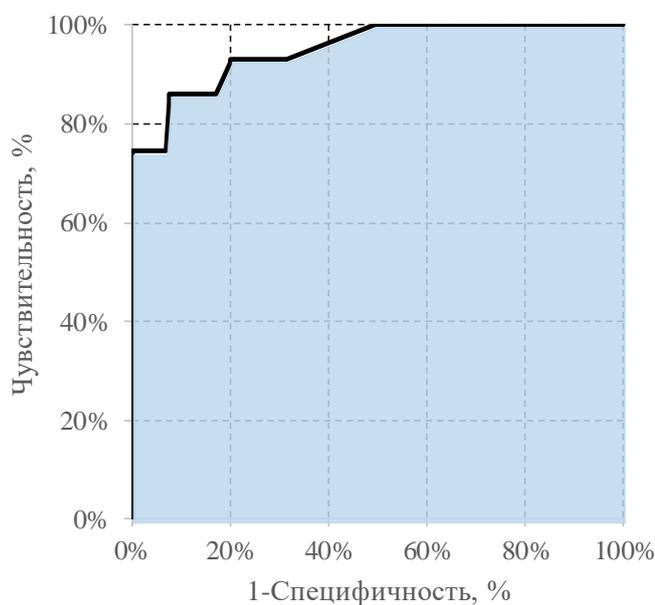


Рисунок 11 - ROC-кривая для целевого показателя «РМЖ»

Таблица 8 - Прогнозные показатели качества, построенного дерева-решений для целевого показателя «РМЖ»

Точка отсечения	50,0%
AuROC	0,95
Чувствительность	86,0%
Специфичность	92,4%
Эффективность	89,2%

Таким образом, на основе метода дерева решений для целевого показателя «РМЖ» было выделено 6 рисков 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 рисковый 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.

Также представляло интерес определить рисковые классы для выявленных нами значимых полиморфизмов, ассоциированных с риском развития РМЖ входящих в каталог GWAS.

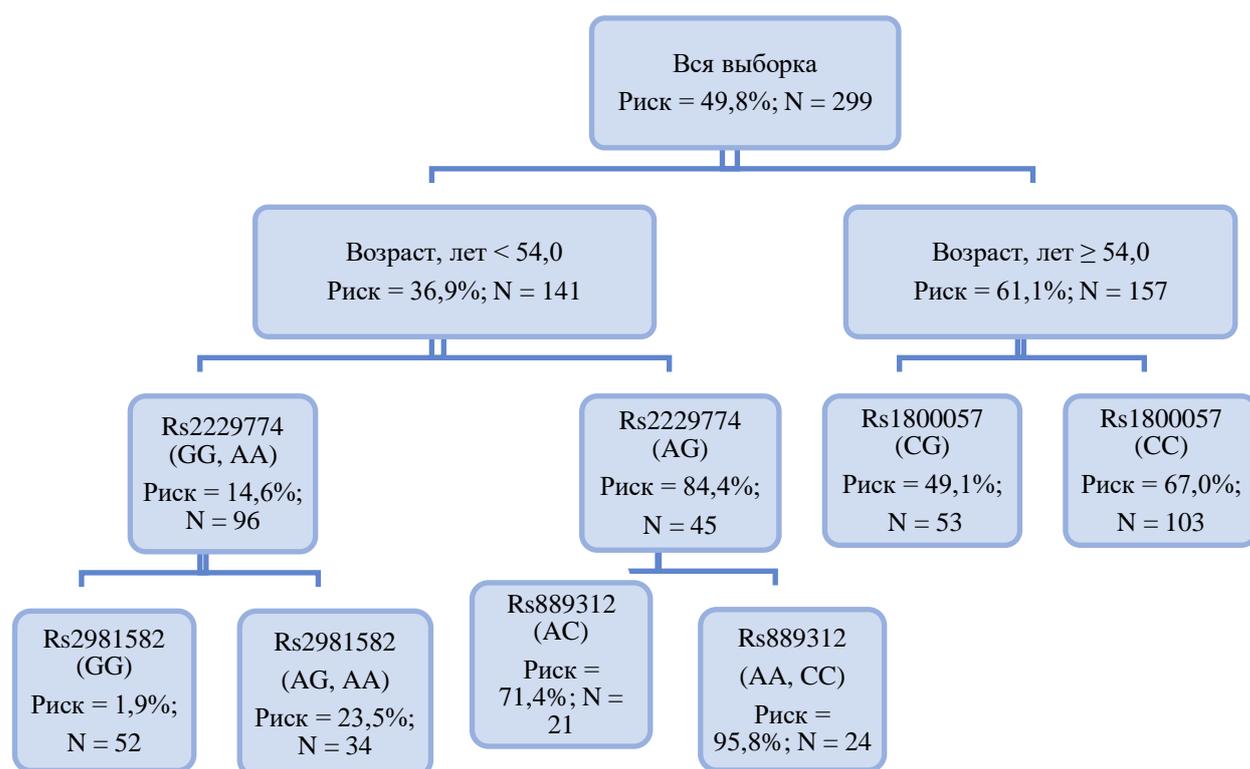


Рисунок 12 - Дерево классификации для показателя «РМЖ»

На рисунке 12 представлена диаграмма дерева-решений для показателя «РМЖ» на основе комбинации пяти влияющих факторов которые

ассоциировались с риском развития РМЖ: «Возраст, лет», «Rs2229774», «Rs2981582», «Rs889312» и «Rs1800057» (по данным GWAS каталога).

Всего с помощью дерева-решений было выделено 6 рискованных классов (таблица 9). Наиболее высокий риск развития показателя «РМЖ» (Риск = 95,8%, Объем группы = 24) наблюдается у пациентов со следующей комбинацией факторов: «Возраст, лет <54,0», «Rs2229774 (AG)» и «Rs889312 (AA, CC)». Наименьший уровень риска развития показателя «РМЖ» (Риск = 1,9%, Объем группы = 52) наблюдается для следующей комбинации факторов: «Возраст, лет <54,0», «Rs2229774 (GG, AA)» и «Rs2981582 (GG)». Самым крупным классом с объемом группы в 103 наблюдений и уровнем риска в 67,0% является следующая комбинация факторов: «Возраст, лет $\geq 54,0$ » и «Rs1800057 (CC)».

Таблица 9 - Отсортированные рискованные классы пациентов для целевого показателя «РМЖ» по убыванию риска

Определение класса	Объем группы	Доля класса, %	Риск, %
Возраст, лет < 54,0 & Rs2229774 (AG) & Rs889312 (AA, CC)	24	8,4%	95,8%
Возраст, лет < 54,0 & Rs2229774 (AG) & Rs889312 (AC)	21	7,3%	71,4%
Возраст, лет $\geq 54,0$ & Rs1800057 (CC)	103	35,9%	67,0%
Возраст, лет $\geq 54,0$ & Rs1800057 (CG)	53	18,5%	49,1%
Возраст, лет < 54,0 & Rs2229774 (GG, AA) & Rs2981582 (AG, AA)	34	11,8%	23,5%
Возраст, лет < 54,0 & Rs2229774 (GG, AA) & Rs2981582 (GG)	52	18,1%	1,9%

Ниже на рисунке 13 и в таблице 10 представлены результаты ROC-анализа и прогнозные показатели качества построенного дерева-решений для целевого показателя «РМЖ». Точка отсечения представляет собой оптимальную границу отделения положительного прогноза от отрицательного.

В таблице 10 приведены результаты ROC анализа и определения AuC с оценкой чувствительности и специфичности изученных показателей в качестве предикторов риска развития РМЖ. Установлено, что «высокое» качество прогноза высокого риска РМЖ имели факторы: Возраст, лет <54,0, Rs2229774 (AG), Rs889312 (AA, CC), так как значение AuROC равной 0,88 свидетельствует о высоком прогнозном качестве данного смоделированного дерева-решений. Учитывая точку отсечения $\geq 67,0\%$, следует считать, что при чувствительности в 75,5% случаях мы будем правильно идентифицировать положительный результат и при специфичности в 93,7% случаях – правильно идентифицировать отрицательный результат.

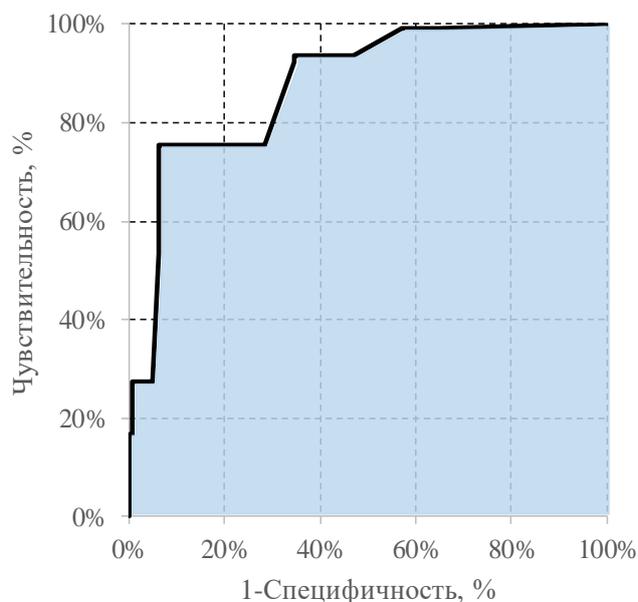


Рисунок 13 - ROC-кривая для целевого показателя «PMЖ»

Таблица 10 - Прогнозные показатели качества, построенного дерева-решений для целевого показателя «PMЖ»

Точка отсечения	67,0%
AuROC	0,88
Чувствительность	75,5%
Специфичность	93,7%
Эффективность	84,6%

На основе данной модели дерева решений для целевого показателя «PMЖ» 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» (по данным GWAS каталога). 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.

По результатам NGS секвенирования из 28 выявленных полиморфизмов в каталоге GWAS найдены 7 рискованных статистически значимых полиморфизмов, ассоциированных с риском развития PMЖ: RARG (Rs2229774), FGFR2 (Rs2981582), ATM (Rs1800057), MAP3K1 (Rs889312), BRCA2 (Rs11571833), FGFR2 (Rs7895676), FGFR2 (Rs1219648).

В результате исследования моделей наследования установлено, что полиморфизм rs2981582 гена FGFR2 увеличивает шансы развития PMЖ по 4 моделям наследования: кодоминантная (ОШ=19.15, 95% ДИ:9.08-40.35 и ОШ=16.82, 95% ДИ: 6.62-42.74), доминантная (ОШ=18.62, 95%ДИ 9-38.51), рецессивная (ОШ=2.28, 95%ДИ 1.12-4.63), сверхдоминантная модель (ОШ=6, 95%ДИ 3.58-10.09).

Полиморфизм rs2229774 гена RARG повышает шансы развития РМЖ по 3 моделям наследования: кодоминантная модель (ОШ=19.47, 95%ДИ 10.56-35.91), доминантная модель (ОШ=18.44, 95%ДИ 10.09-33.7), сверхдоминантная модель (ОШ=19.62, 95%ДИ 10.64-36.17).

Полиморфизм rs889312 гена MAP3K1 повышает шансы развития РМЖ по 2 моделям наследования: доминантная модель (ОШ=1.78, 95%ДИ 1.04-3.06), рецессивная модель (ОШ=2.17, 95%ДИ 1.19-3.95).

Полиморфизм rs137852985 гена BRIP1 увеличивает шансы развития РМЖ по 4 моделям наследования: кодоминантная модель (ОШ=53.58, 95%ДИ 22.72-126.32), доминантная модель (ОШ=39.56, 95%ДИ 18.61-84.1), сверхдоминантная модель (ОШ=47.55, 95%ДИ 20.36-111.07), лог-аддитивная модель (ОШ=24.41, 95%ДИ 12.3-48.46).

Полиморфизм rs137852576 гена AR повышает шансы развития РМЖ кодоминантной модели (ОШ=2.24, 95%ДИ 1.35-3.72).

При однофакторном прогнозировании риска развития РМЖ выявлены ТОП – 32 статистически значимых фактора с повышением уровней рисков от 69,7% до 90,6%, из которых наиболее важными являются: «Rs137852985 (TC, TT)», «Rs2229774 (AG, AA)» и «Rs2981582 (AG, AA)».

Мы продемонстрировали возможность прогнозирования риска развития РМЖ с высоким уровнем оценки риска (95,8%) при сочетании полиморфизмов «Rs2229774 (AG)», «Rs889312 (AA, CC)» и показателя «Возраст, лет < 54,0». Прогнозное качество построенной модели имеет высокий уровень (0,88).

Поскольку выявленные нами значимые полиморфизмы генов (Rs2229774 гена RARG, Rs2981582 гена FGFR2, Rs1800057 гена ATM, Rs889312 гена MAP3K1, Rs11571833 гена BRCA2, Rs7895676 гена FGFR2, Rs1219648 гена FGFR2, Rs137852985 гена BRIP1) связаны с риском развития повреждения и репарации ДНК, для нас представлял интерес изучить наличие двухцепочечных разрывов ДНК у женщин с раком молочной железы.

3.2 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) с помощью системы Aklides (MEDIPAN, Германия), состоящей из флюоресцентного анализатора и программного обеспечения AKLIDES Nuk.

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. Всем пациенткам согласно Клиническому протоколу диагностики и лечения «РМЖ» РК (№56 от «01» марта 2019 г.) проводилась химиотерапия в зависимости от гистотипа опухоли.

В контрольную группу вошли 24 пациентки с верифицированным диагнозом «Доброкачественное образование молочных желез» (M2 по BI-RADS), средний возраст составил $43,08 \pm 10,12$ лет.

Анализ автоматизированной системы AKLIDES показал, что среднее количество посчитанных клеток в основной группе пациенток с РМЖ (113) и в контрольной группе (108) соответствует минимальному количеству (100) клеток, необходимых для проведения исследования.

Анализ данных, полученных для всей исследуемой выборки (основная и контрольная группы), позволяет утверждать, что данных объемов достаточно для проведения статистического анализа и формирования статистических выводов.

Для оценки очагов γ -H2AX ДНР ДНК использовались 12 параметров в канале разрывов (FITC) и в канале репарации (APC) автоматизированной системы AKLIDES:

1. ядра с повышенной интенсивностью свечения
2. средний диаметр ядра
3. среднее значение интенсивности для всех очагов
4. количество клеток с очагами
5. общее количество очагов
6. среднее количество очагов в клетке
7. количество обнаруженных кластеров
8. среднее значение всех очагов в клетке
9. процент поврежденных клеток
10. среднее значение всех очагов в кластере с низкой интенсивностью
11. процент ядер с очагами в кластерах с низкой интенсивностью
12. количество перекрывающихся очагов в двух каналах.

В таблицах 11-12 представлены результаты анализа очагов γ -H2AX в контрольной и основной группе (этап 1) по каналу разрывов (FITC) и каналу репарации (APC):

- Контрольная группа - пациентки с доброкачественным образованием
- Основная группа - до начала 1-го курса ХТ (исходный уровень) – этап 1.

Для сравнения количественных переменных использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, а для сравнения бинарных и номинальных показателей – критерий Хи-квадрат Пирсона.

Таблица 11 - Сравнение показателей в основной (РМЖ) и контрольной группах («M ± S») по каналу разрывов FITC

Показатель	Группа		Уровень P
	РМЖ (N=29)	Контроль (N=24)	
FITC			
1	2	3	4
Средний диаметр ядра	$7,34 \pm 0,68$	$7,00 \pm 0,52$	0,0382

Продолжение таблицы 11

1	2	3	4
Ядра с повышенной интенсивностью свечения	35,95 ± 10,84	39,13 ± 10,25	0,1921
Количество клеток с очагами	55,66 ± 37,00	58,25 ± 31,50	0,5918
Общее количество очагов	167,17 ± 219,72	141,67 ± 119,92	0,7342
Среднее значение интенсивности для всех очагов	69,88 ± 17,97	81,83 ± 19,28	0,0166
Количество обнаруженных кластеров	0,24 ± 0,79	0,12 ± 0,45	0,5477
Среднее количество очагов в клетке	1,45 ± 1,58	1,29 ± 1,10	0,9005
Среднее значение всех очагов в клетке	1,46 ± 1,59	1,30 ± 1,10	0,8863
Процент поврежденных клеток	51,13 ± 29,87	53,22 ± 27,89	0,8025
Среднее значение всех очагов в кластере с низкой интенсивностью	2,45 ± 1,81	2,10 ± 1,40	0,5554
Процент ядер с очагами в кластерах с низкой интенсивностью	72,46 ± 27,92	74,27 ± 23,13	0,8442
Количество перекрывающихся очагов в двух каналах	18,62 ± 19,12	9,71 ± 13,69	0,0486

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 ($p = 0,0486$) (рисунок 14-16).



Рисунок 14 - Сравнение показателя «Средний диаметр ядра» в основной и контрольной группах

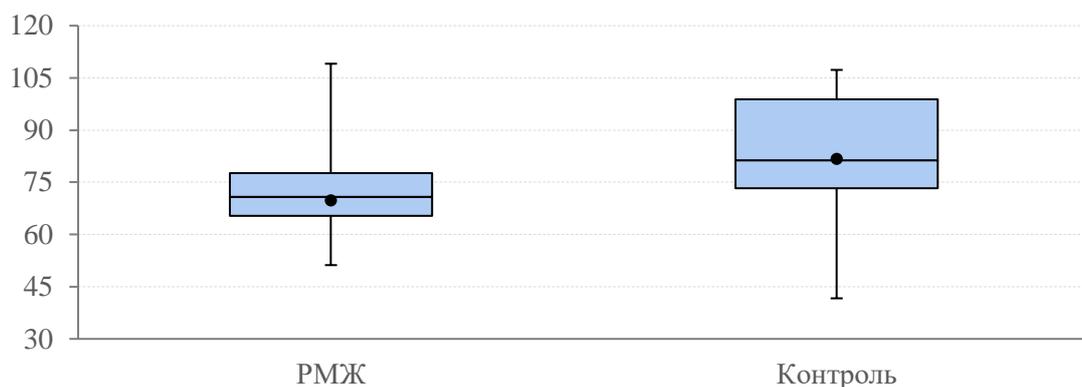


Рисунок 15 - Сравнение показателя «Среднее значение интенсивности для всех очагов» в основной и контрольной группах

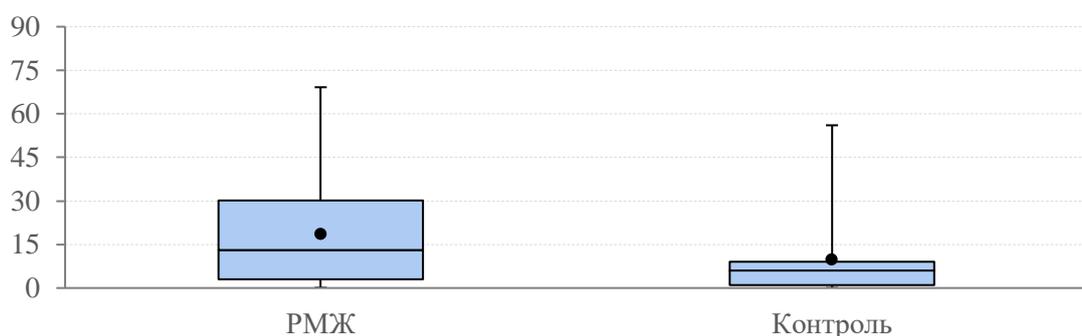


Рисунок 16 - Сравнение показателя «Количество перекрывающихся очагов в двух каналах» в основной и контрольной группах

Таблица 12 - Сравнение показателей в основной (PMЖ) и контрольной группах («M ± S») на канале репарции APC

Показатель	Группа		Уровень P
	PMЖ (N=29)	Контроль (N=24)	
APC			
Ядра с повышенной интенсивностью свечения	455,23 ± 286,58	738,93 ± 512,67	0,0166
Количество клеток с очагами	76,79 ± 25,57	76,04 ± 20,51	0,7749
Общее количество очагов	288,10 ± 251,77	217,88 ± 141,48	0,5494
Средний диаметр очагов	0,56 ± 0,05	0,54 ± 0,03	0,0830
Среднее значение интенсивности для всех очагов	302,94 ± 81,62	369,91 ± 109,65	0,0118
Количество обнаруженных кластеров	49,34 ± 80,94	46,50 ± 100,59	0,9712
Среднее количество очагов в клетке	2,81 ± 2,96	2,00 ± 1,28	0,7750
Среднее значение всех очагов в клетке	8,05 ± 13,26	6,68 ± 11,43	0,9715
Процент поврежденных клеток	70,38 ± 23,74	69,99 ± 17,44	0,6551
Среднее значение всех очагов в кластере с низкой интенсивностью	3,17 ± 2,83	2,28 ± 1,18	0,2918
Процент ядер с очагами в кластерах с низкой интенсивностью	81,74 ± 16,52	79,40 ± 10,93	0,1333

При сравнении показателей основной и контрольной групп на канале репарации «АРС», 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 ($p = 0,0118$) (рисунок 17-18).

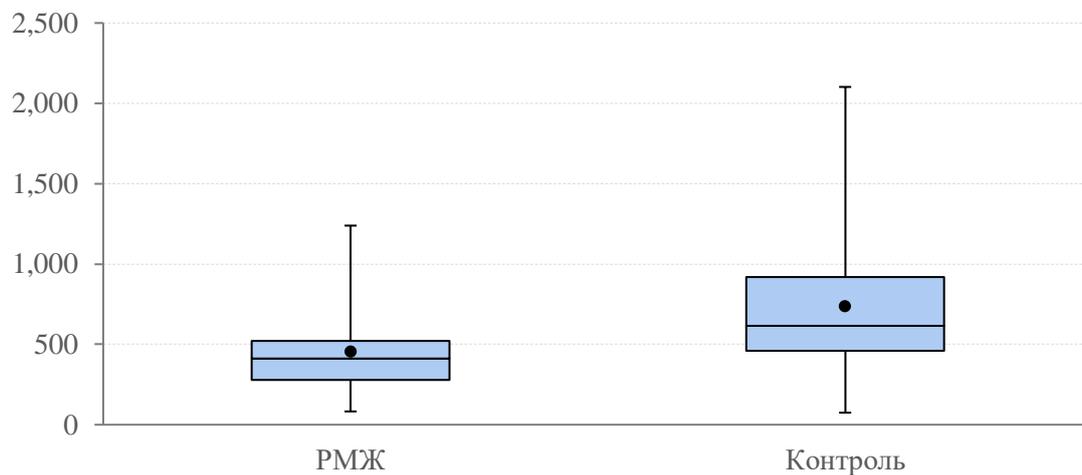


Рисунок 17 - Сравнение показателя «Ядра с повышенной интенсивности свечения» в основной и контрольной группах

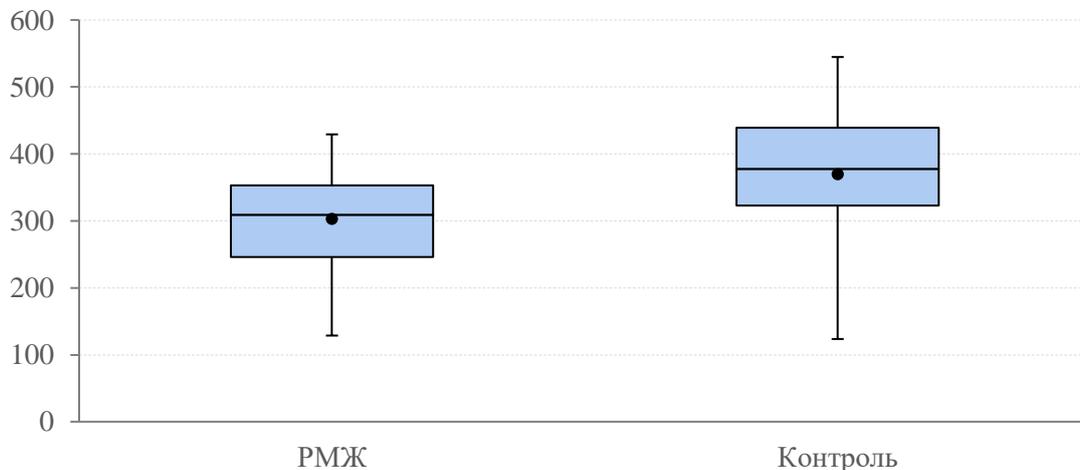


Рисунок 18 - Сравнение показателя «Среднее значение интенсивности для всех очагов» в основной и контрольной группах

У больных раком молочной железы в канале разрывов FITC показатели «Средний диаметр ядра», «Количество перекрывающихся очагов в двух каналах» оказалось выше, чем у больных доброкачественными образованиями, в то время как показатель «Среднее значение интенсивности для всех очагов» был ниже, чем в контрольной группе.

В канале репарации APC показатели «Ядра с повышенной интенсивности свечения», «Среднее значение интенсивности для всех очагов» у больных РМЖ оказались ниже, чем у больных доброкачественными образованиями. Выявленные изменения показателей по каналам разрывов FITC и репарации APC позволяют говорить о том, что основная и контрольная группа отличаются друг от друга, и это, возможно, может служить диагностическим маркером для выявления рака молочной железы.

Однофакторное прогнозирование показателя «РМЖ, есть»

Нами получены результаты статистического однофакторного прогнозирования целевого показателя развития рака молочной железы «РМЖ,+» для количественных и бинарных факторов.

Статистическая значимость влияния показателей на бинарную целевую переменную проведено с помощью критерия Хи-квадрат Пирсона.

Все факторы сортировались по убыванию значимости (статистика Хи-квадрат), и, таким образом, были отобраны ключевые факторы развития рисков события «РМЖ,+».

В таблице 13 представлен ТОП-12 перечень рисков факторов показателя «РМЖ, +».

Таблица 13 - ТОП-12 ключевых факторов влияния на риск развития «РМЖ, +»

Фактор	РМЖ,+ : частота (риск, %)		Изменение риска (95% ДИ)	Относительный риск (95% ДИ)	Уровень Р
	Фактор: Нет	Фактор: Есть			
1	2	3	4	5	6
Возраст, лет $\geq 48,0$	5 (23,8%)	24 (75,0%)	51,2 (27,6; 74,8)%	3,15 (1,43; 6,95)	0,0003
Среднее значение интенсивности для всех очагов (Этап 1) $< 341,6$	8 (32,0%)	21 (75,0%)	43,0 (18,7; 67,3)%	2,34 (1,27; 4,31)	0,0017
Возрастные группы (После 50 лет)	12 (37,5%)	17 (81,0%)	43,5 (19,7; 67,2)%	2,16 (1,32; 3,53)	0,0019
Среднее значение интенсивности для всех очагов (Этап 1) $< 77,8$	7 (31,8%)	22 (71,0%)	39,1 (14,0; 64,3)%	2,23 (1,16; 4,28)	0,0048
Ядра с повышенной интенсивности свечения (Этап 1) $< 574,8$	6 (30,0%)	23 (69,7%)	39,7 (14,2; 65,2)%	2,32 (1,15; 4,71)	0,0049
Средний диаметр очагов (Этап 1) $\geq 0,5$	21 (46,7%)	8 (100,0%)	53,3 (38,8; 67,9)%	2,14 (1,57; 2,93)	0,0052
Средний диаметр ядра (Этап 1) $\geq 7,5$	15 (41,7%)	14 (82,4%)	40,7 (16,4; 64,9)%	1,98 (1,27; 3,08)	0,0055
Процент поврежденных клеток (Этап 1) $\geq 89,3$	19 (45,2%)	10 (90,9%)	45,7 (23,0; 68,4)%	2,01 (1,37; 2,94)	0,0068

Продолжение таблицы 13

1	2	3	4	5	6
Количество перекрывающихся очагов двух каналов (Этап 1) $\geq 9,0$	11 (39,3%)	18 (72,0%)	32,7 (7,5; 58,0)%	1,83 (1,09; 3,09)	0,0169
Средний диаметр очагов (Этап 1) $\geq 0,5$	9 (37,5%)	20 (69,0%)	31,5 (5,8; 57,1)%	1,84 (1,04; 3,26)	0,0220
Ядра с повышенной интенсивностью свечения (Этап 1) $< 35,6$	12 (41,4%)	17 (70,8%)	29,5 (3,9; 55,0)%	1,71 (1,03; 2,83)	0,0320
Процент ядер с очагами в кластерах с низкой интенсивностью (Этап 1) $\geq 87,3$	15 (44,1%)	14 (73,7%)	29,6 (3,7; 55,5)%	1,67 (1,05; 2,66)	0,0381

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)». Замыкают список статистически значимых факторов «Процент ядер с очагами в кластерах с низкой интенсивностью (Этап 1) $\geq 87,3$ », «Ядра с повышенной интенсивности свечения (Этап 1) $< 35,6$ » и «Средний диаметр очагов (Этап 1) $\geq 0,5$ », которые повышают уровень риска с 69,0% до 73,7% (таблица 13).

Прогностическая оценка анализа очагов γ -H2AX в качестве диагностического маркера проведена с помощью ROC-анализа (receiver operating characteristic) в координатах графиков «чувствительность–специфичность» с вычислением AUC (area under ROC curve) – площади под ROC-кривой и точки отсечения (cut-off value) – значения оптимального порога отсечения переменной [172]. При проверке статистических гипотез значения $P < 0,05$ считались как статистически значимые.

На рисунке 19 представлены результаты проведенного ROC-анализа по каналам разрывов FITC и репарации APC целевого показателя «Среднее значение интенсивности для всех очагов».

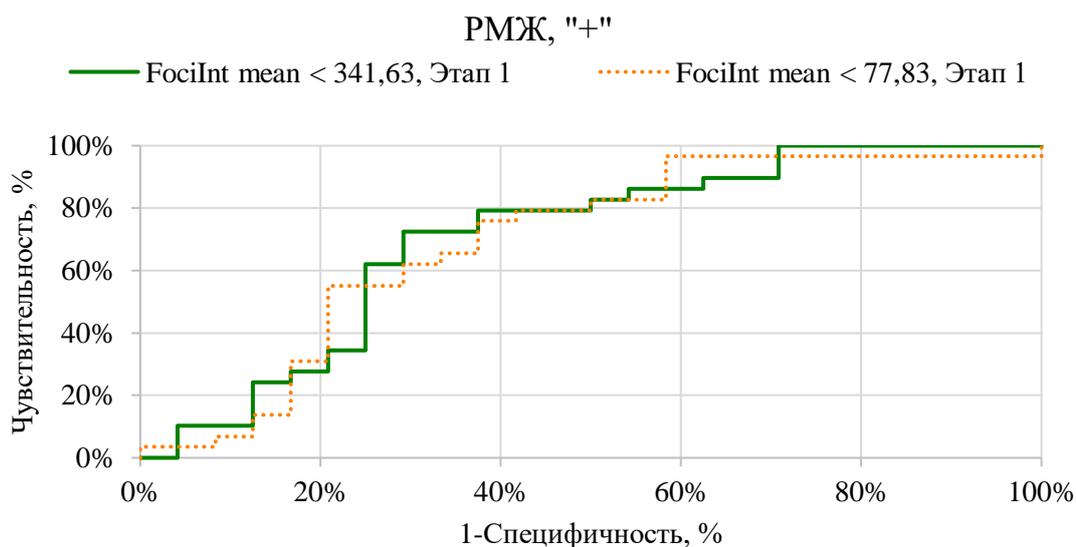


Рисунок 19 - Прогностические показатели для целевого показателя «Среднее значение интенсивности для всех очагов» по каналу разрывов FITC и репарации APC

В таблице 14 приведены результаты ROC-анализа с определением AUC и точки отсечения с оценкой чувствительности и специфичности изученного целевого показателя «Среднее значение интенсивности для всех очагов» по каналам разрывов FITC и репарации APC в качестве диагностического индикатора РМЖ.

Таблица 14 - Прогностические показатели для целевого показателя «Среднее значение интенсивности для всех очагов» по каналу разрывов FITC и по каналу репарации APC

Показатель	Значение	
	по каналу разрывов FITC	по каналу репарации APC
Точка отсечения	341,6	77,83
Площадь под кривой (AUC)	0,70	0,69
Чувствительность	72,41%	75,86%
Специфичность	70,83%	62,50%
Эффективность	71,62%	69,18%

Установлено, что модель имеет «хорошее» и «среднее» качество диагностического индикатора РМЖ для показателя «Среднее значение интенсивности для всех очагов» по каналам разрывов FITC (0,70) и репарации APC (0,69), соответственно ($P=0,001$). Учитывая точку отсечения $\geq 341,6$ (FITC) и $\geq 77,83$ (APC), следует считать, что при чувствительности в 72,41% (FITC) и 75,86% (APC) случаях мы будем правильно идентифицировать положительный результат и при специфичности в 70,83% (FITC) и 62,50% (APC) случаях – правильно идентифицировать отрицательный результат.

Затем мы решили определить, имеются ли изменения в разрывах ДНК γ -H2AX в двух каналах в зависимости от этапа проведения химиотерапии. В связи с малым количеством наблюдений в группе пациенток с РМЖ не было возможным провести статистическую обработку данных в зависимости от вида химиотерапии. Для проверки альтернативной гипотезы о значимых изменениях, возможно происходящих в разные периоды химиотерапии у пациенток основной группы, нами был проведен анализ данных по каналам разрывов «FITC» и репарации «APC» [173].

В доступной нам литературе не найдено рекомендации по проведению исследования разрывов ДНК как маркера эффективности химиотерапии при онкозаболеваниях молочной железы у пациенток в реальном времени. Поэтому нами проведено исследование в пилотном проекте, разработанном по предложению создателей платформы Аклидес (Германия).

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

Для сравнения количественных показателей мы использовали непараметрический критерий Фридмана, а для сравнения бинарных показателей для зависимых выборок – критерий Хи-квадрат МакНемара.

В таблице 15 и на рисунках 20 а,б-21а,б представлены результаты статистического анализа изменения количественных показателей по каналу разрывов «FITC» по периодам ХТ: «Этап 1», «Этап 2», «Этап 3» и «Этап 4».

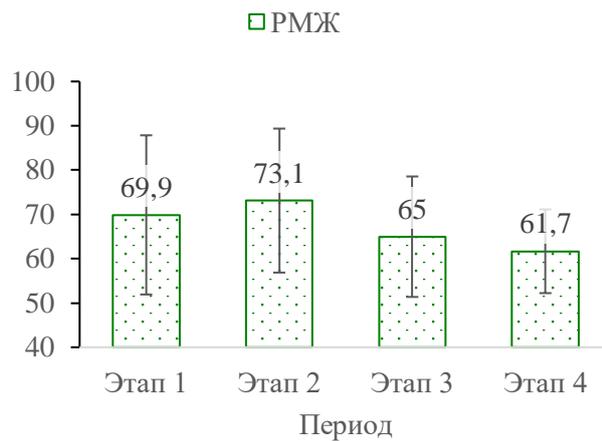
Таблица 15 - Анализ динамики показателей по каналу разрывов «FITC» по периодам ХТ: «Этап 1», «Этап 2», «Этап 3» и «Этап 4»

Показатель	M ± S, (%), Этап 1	M ± S (%), Этап 2	M ± S (%), Этап 3	M ± S (%), Этап 4	Уровень P
1	2	3	4	5	6
Средний диаметр ядра	7,34 ± 0,68	7,68 ± 0,80 (4,54%)	7,48 ± 0,69 (1,91%)	7,64 ± 0,75 (4,01%)	0,4672
Ядра с повышенной интенсивностью свечения	35,95 ± 10,84	35,30 ± 10,36 (-1,79%)	34,16 ± 9,92 (-4,98%)	31,49 ± 8,87 (-12,39%)	0,9058
Количество клеток с очагами	55,66 ± 37,00	68,90 ± 43,19 (23,79%)	68,79 ± 41,12 (23,61%)	60,00 ± 53,32 (7,81%)	0,4902
Общее количество очагов	167,17 ± 219,72	241,69 ± 329,02 (44,58%)	200,38 ± 213,00 (19,86%)	162,55 ± 200,66 (-2,76%)	0,6423
Среднее значение интенсивности для всех очагов	69,88 ± 17,97	73,11 ± 16,25 (4,62%)	64,96 ± 13,60 (-7,05%)	61,67 ± 9,45 (-11,75%)	0,0075

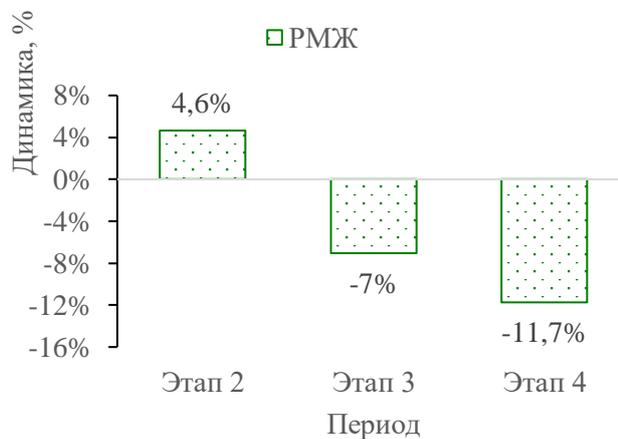
Продолжение таблицы 15

1	2	3	4	5	6
Количество обнаруженных кластеров	0,24 ± 0,79	0,34 ± 1,08 (42,86%)	0,14 ± 0,58 (-42,86%)	0,07 ± 0,26 (- 71,43%)	0,6770
Среднее количество очагов в клетке	1,45 ± 1,58	2,01 ± 1,92 (38,34%)	1,78 ± 1,56 (22,70%)	1,31 ± 1,25 (- 10,05%)	0,6763
Среднее значение всех очагов в клетке	1,46 ± 1,59	2,02 ± 1,93 (38,63%)	1,79 ± 1,57 (22,58%)	1,31 ± 1,26 (- 10,20%)	0,6763
Процент поврежденных клеток	51,13 ± 29,87	62,01 ± 29,51 (21,27%)	61,71 ± 29,63 (20,68%)	50,17 ± 30,52 (-1,89%)	0,4385
Среднее значение всех очагов в кластере с низкой интенсивностью	2,45 ± 1,81	3,19 ± 2,20 (30,10%)	3,11 ± 1,92 (26,76%)	2,22 ± 1,64 (- 9,40%)	0,1447
Процент ядер с очагами в кластерах с низкой интенсивностью	72,46 ± 27,92	81,74 ± 17,92 (12,80%)	83,33 ± 18,95 (15,00%)	71,06 ± 27,13 (-1,94%)	0,4898
Количество перекрывающихся очагов двух каналов	18,62 ± 19,12	33,59 ± 28,17 (80,37%)	28,86 ± 24,71 (55,00%)	22,83 ± 35,19 (22,59%)	0,0237

Полученные нами данные показали, что во время проведения химиотерапии два показателя по каналу разрывов «FITC» статистически значимо различаются. Наблюдается увеличение значения показателя «Среднее значение интенсивности для всех очагов» (в основной группе) после получения 1-го курса химиотерапии, с постепенным снижением его значения (+4,6%, - 7%, -11,7%; $p = 0,0075$) (рисунок 20б). Значения показателя «Количество перекрывающихся очагов в двух каналах» увеличиваются после проведения 1-го курса химиотерапии (в среднем на 15,0), далее идет постепенное снижение до начала 3-го курса ХТ ($p = 0,0237$). Полученные данные позволяют сделать вывод о значительной реакции организма на проведение 1-го курса химиотерапии.



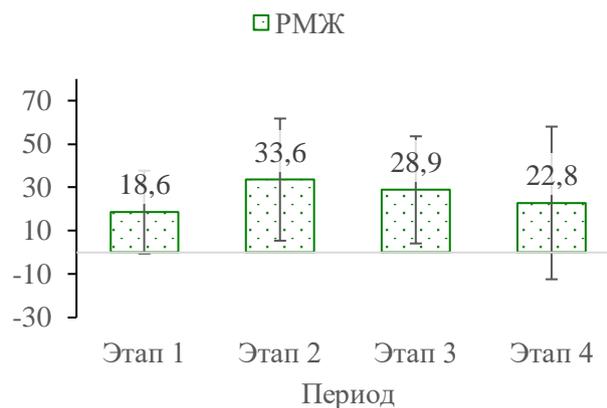
а)



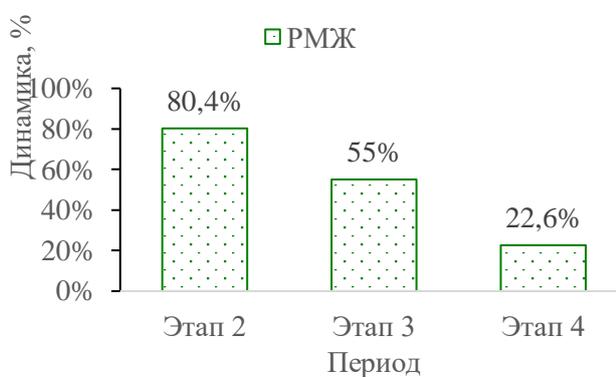
б)

Рисунок 20 - Динамика показателя «Среднее значение интенсивности для всех очагов» в зависимости от этапов ХТ в (%) в основной группе

Колебание показателя «Среднее значение интенсивности для всех очагов» незначительно повышается после 1-го курса ХТ (+4,6%), далее идет снижение до -7% непосредственно перед 2-м курсом ХТ, перед началом 3-го курса наблюдается снижение до -11,7% (рисунок 20 б).



а)



б)

Рисунок 21 - Динамика показателя «Количество перекрывающихся очагов двух каналах» в зависимости от этапов ХТ в (%) в основной группе

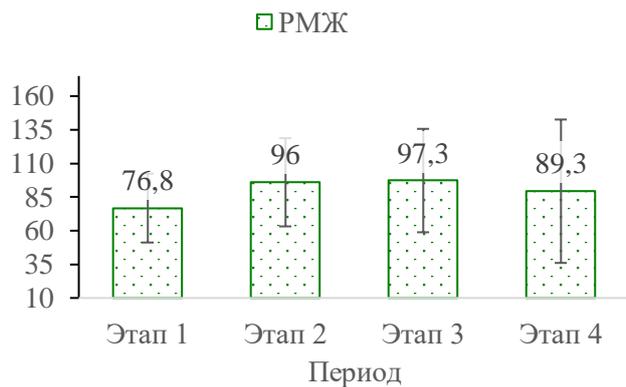
Колебание показателя «Количество перекрывающихся очагов в двух каналах» в динамике изменяется от +22,6% до +80,4% (рисунок 21б). Идет резкое увеличение после проведения 1-го курса химиотерапии на 80,4%, с незначительным снижением перед 2-м курсом ХТ (55,0%), а перед 3-м курсом ХТ – 22,6%.

В таблице 16 и на рисунках 22а-30б представлены результаты статистического анализа изменения количественных показателей по каналу репарации «АРС» по периодам ХТ «Этап 1», «Этап 2», «Этап 3» и «Этап 4».

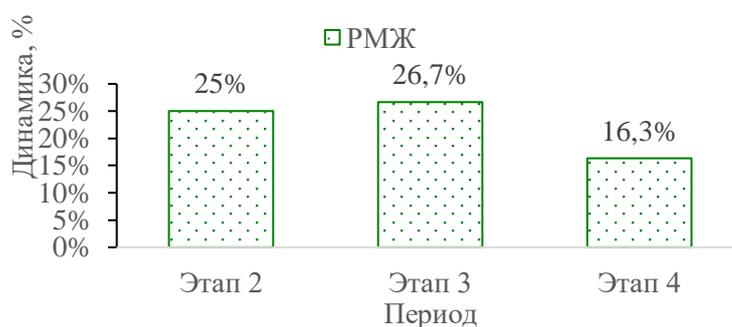
Таблица 16 - Анализ динамики показателей по каналу репарации «АРС» по периодам: «Этап 1», «Этап 2», «Этап 3» и «Этап 4»

Показатель	M ± S, Этап 1	M ± S (%), Этап 2	M ± S (%), Этап 3	M ± S (%), Этап 4	Уровень P
Ядра с повышенной интенсивности свечения	455,23 ± 286,58	410,97 ± 272,07 (- 9,72%)	371,62 ± 266,57 (- 18,37%)	250,36 ± 135,94 (- 45,00%)	0,0783
Количество клеток с очагами	76,79 ± 25,57	96,00 ± 32,79 (25,01%)	97,28 ± 38,43 (26,67%)	89,34 ± 53,29 (16,34%)	0,0465
Общее количество очагов	288,10 ± 251,77	492,34 ± 428,49 (70,89%)	718,62 ± 541,01 (149,43%)	658,79 ± 507,66 (128,67%)	0,0007
Среднее значение интенсивности для всех очагов	302,94 ± 81,62	315,55 ± 85,46 (4,16%)	278,64 ± 100,81 (- 8,02%)	232,85 ± 84,27 (- 23,14%)	0,0664
Количество обнаруженных кластеров	49,34 ± 80,94	75,52 ± 124,35 (53,04%)	177,03 ± 141,17 (258,77%)	124,34 ± 113,04 (151,99%)	0,0020
Среднее количество очагов в клетке	2,81 ± 2,96	4,28 ± 2,73 (52,63%)	6,05 ± 3,36 (115,46%)	6,43 ± 3,57 (129,11%)	<0,0001
Среднее значение всех очагов в клетке	8,05 ± 13,26	10,20 ± 13,13 (26,71%)	37,47 ± 59,50 (365,48%)	17,52 ± 16,10 (117,66%)	0,0003
Процент поврежденных клеток	70,38 ± 23,74	86,70 ± 12,73 (23,19%)	87,17 ± 17,30 (23,86%)	84,81 ± 22,83 (20,51%)	<0,0001
Среднее значение всех очагов в кластере с низкой интенсивностью	3,17 ± 2,83	4,53 ± 2,69 (42,76%)	6,27 ± 3,33 (97,41%)	6,67 ± 3,56 (110,09%)	<0,0001
Среднее значение всех очагов в кластере с низкой интенсивностью в кластере	8,42 ± 13,14	10,45 ± 13,04 (24,12%)	37,69 ± 59,43 (347,76%)	17,76 ± 16,01 (110,98%)	0,0003
Процент ядер с очагами в кластерах с низкой интенсивностью	81,74 ± 16,52	89,85 ± 12,17 (9,93%)	89,65 ± 14,79 (9,69%)	87,21 ± 23,26 (6,69%)	0,0021

В рассматриваемый период времени в канале репарации «АРС» 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 ($p=0,0021$).



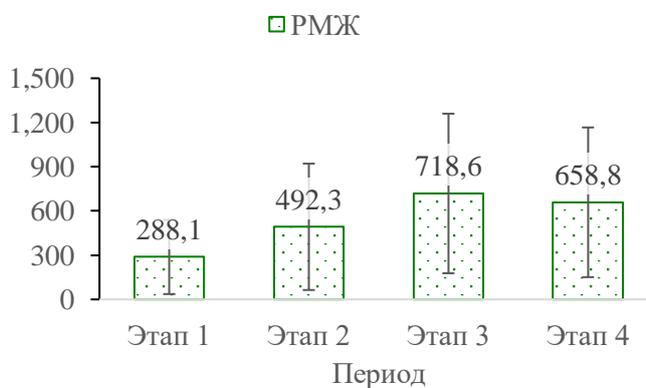
а)



б)

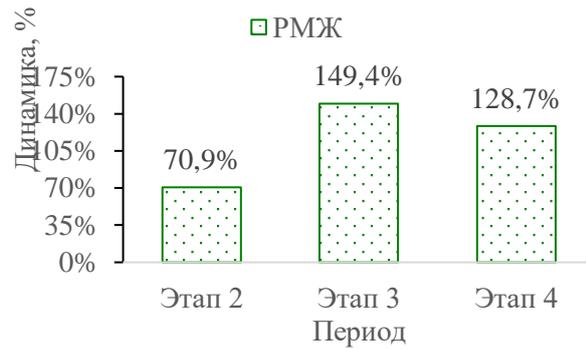
Рисунок 22 - Динамика показателя «Количество клеток с очагами» в зависимости от этапов ХТ (в %) в основной группе

Значения показателя «Количество клеток с очагами» по сравнению с исходным уровнем колеблются от 25% до 26,7% с последующим снижением до 16,3% (рисунок 22 б).



а)

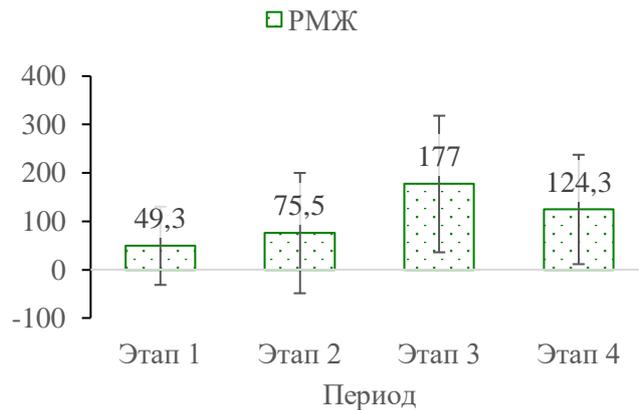
Рисунок 23 - Динамика показателя «Общее количество очагов» в зависимости от этапов ХТ в основной группе, лист 1



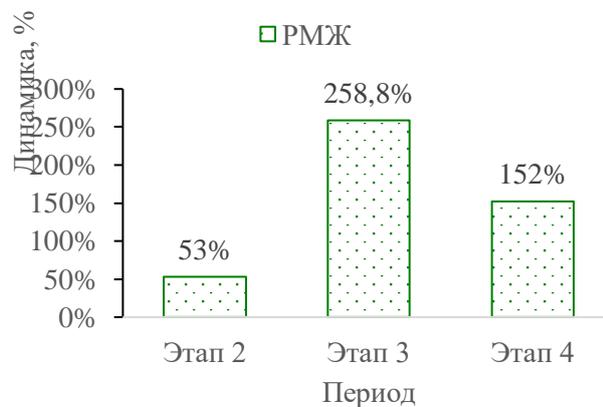
б)

Рисунок 23, лист 2

Показатель «Общее количество очагов» в сравнении с исходом возрастает от +70,9% до +149,4%, и перед началом 3-го курса составляет 128,7% (рисунок 23б).



а)



б)

Рисунок 24 - Динамика показателя «Количество обнаруженных кластеров» в зависимости от этапов ХТ (в %) в основной группе

Показатель «Количество обнаруженных кластеров» незначительно повышается после 1-го курса ХТ (+53,0%), с резким повышением до +258,8% непосредственно перед 2-м курсом ХТ, с последующим снижением до 152,0% перед началом 3-го курса (рисунок 24б).

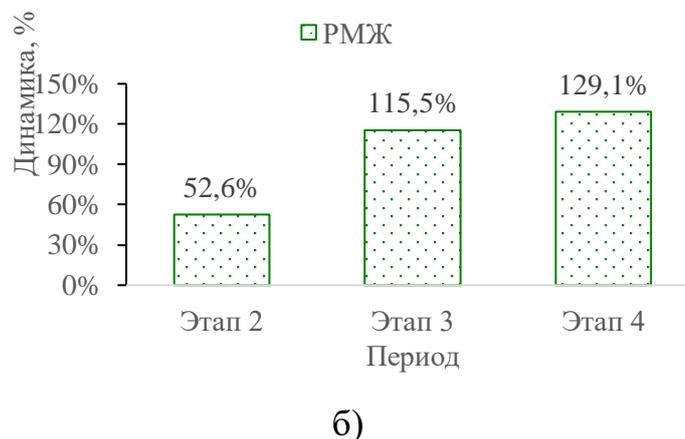
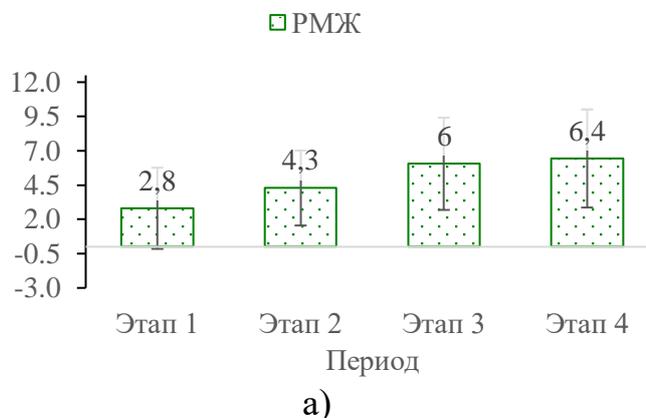
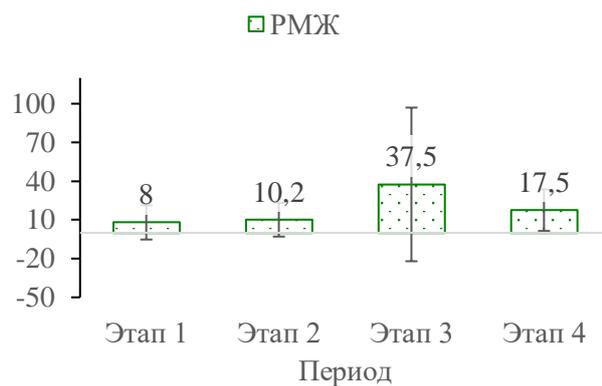
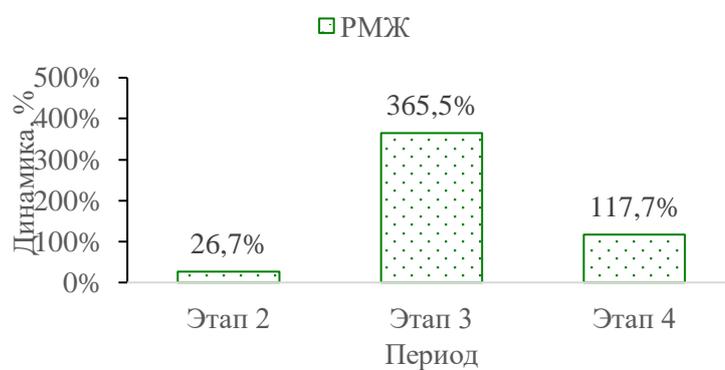


Рисунок 25 - Динамика показателя «Среднее количество очагов в клетке» в зависимости от этапов ХТ (в %) в основной группе

Отмечается постепенное увеличение значения показателя «Среднее количество очагов в клетке» от +52,6% до 115,5% и +129,1% по сравнению с исходом (рисунок 25б).



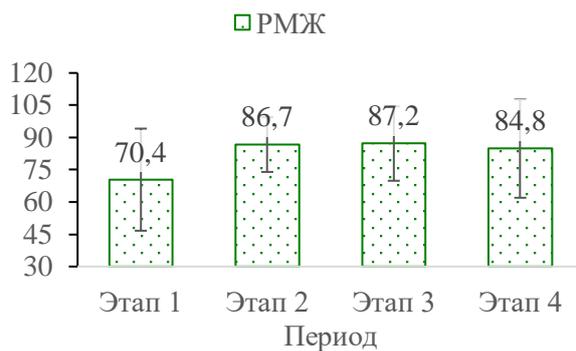
а)



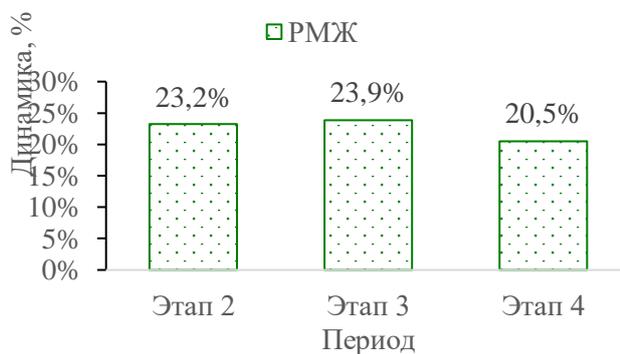
б)

Рисунок 26 - Динамика показателя «Среднее значение всех очагов в клетке» в зависимости от этапов ХТ (в %) в основной группе

Показатель «Среднее значение всех очагов в клетке» незначительно повышается после 1-го курса ХТ (+26,7%) с резким повышением до +365,5% непосредственно перед 2-м курсом ХТ, с последующим снижением до 117,7% перед началом 3-го курса ХТ (рисунок 26 б).



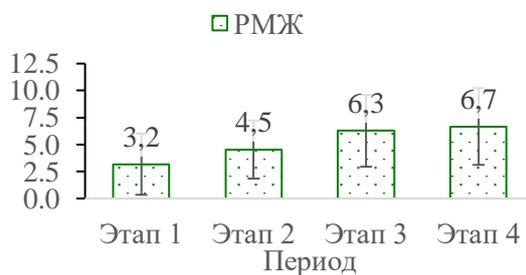
а)



б)

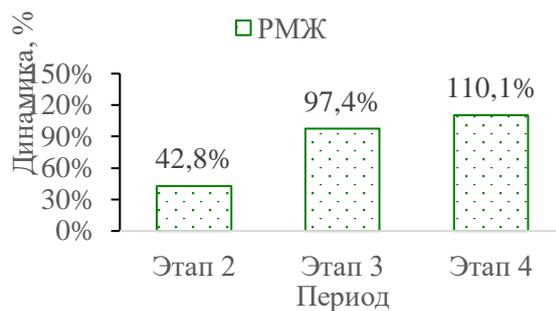
Рисунок 27 - Динамика показателя «Процент поврежденных клеток» в зависимости от этапов ХТ (в %) в основной группе

Показатель «Процент поврежденных клеток» по сравнению с исходным уровнем колеблется от +20,5% до +23,9% и 20,5%. (рисунок 27б).



а)

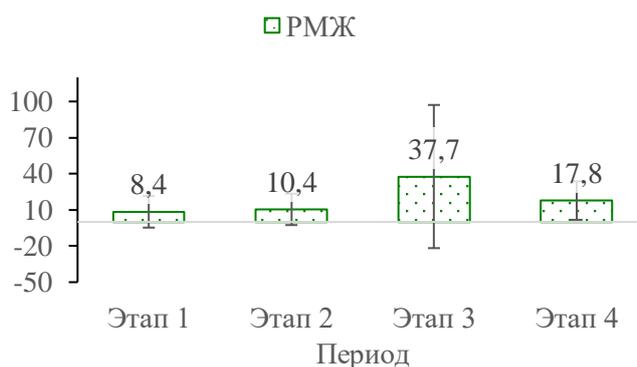
Рисунок 28 - Динамика показателя «Среднее значение всех очагов в кластере с низкой интенсивностью в кластере» в зависимости от этапов ХТ (в %) в основной группе, лист 1



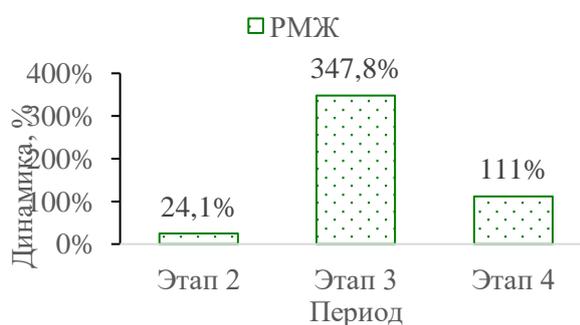
б)

Рисунок 28, лист 2

Показатель «Среднее значение всех очагов в кластере с низкой интенсивностью в кластере» по сравнению с исходным уровнем колеблется от +42,8% до +97,4% далее идет незначительное увеличение перед началом 3-го курса на 110,1% (рисунок 28б).



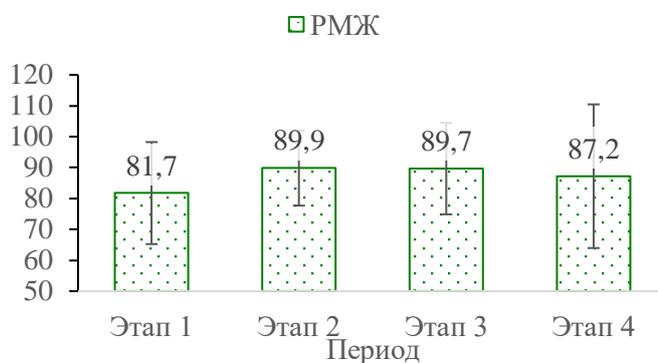
а)



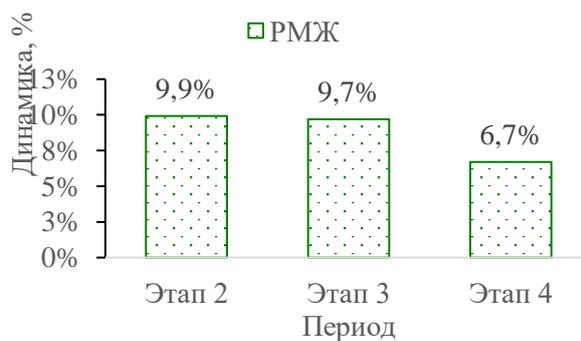
б)

Рисунок 29 - Динамика показателя «Среднее значение всех очагов в кластере с низкой интенсивностью» в зависимости от этапов ХТ (в %) в основной группе

Показатель «Среднее значение всех очагов в кластере с низкой интенсивностью» незначительно повышается после 1-го курса ХТ (+24,1%) с резким повышением до +347,8% перед 2-м курсом ХТ и с последующим снижением до 111,0% (рисунок 29 б).



а)



б)

Рисунок 30 - Динамика показателя «Процент ядер с очагами в кластерах с низкой интенсивностью» в зависимости от этапов ХТ (в %) в основной группе

Значения показателя «Процент ядер с очагами в кластерах с низкой интенсивностью» по сравнению с исходным уровнем колеблются от +9,9% и +9,7% перед началом 2-го курса ХТ и далее идет незначительное снижение перед началом 3-го курса на 6,7% (рисунок 30б).

Выявленные статистически значимые изменения по 11 показателям в канале репарации АРС 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.

Далее мы посмотрели динамику соотношений двуцепочечных разрывов/репараций в ходе химиотерапии по 4 этапам (таблица 17).

Таблица 17 - Динамика соотношений двуцепочечных разрывов/репараций

Показатель	Этап 1		Этап 2		Этап 3		Этап 4	
	FITC	APC	FITC	APC	FITC	APC	FITC	APC
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ядра с повышенной интенсивностью свечения	35,95 ± 10,84	455,23 ± 286,58	35,30 ± 10,36 (-1,79%)	410,97 ± 272,07 (-9,72%)	34,16 ± 9,92 (-4,98%)	371,62 ± 266,57 (-18,37%)	31,49 ± 8,87 (-12,39%)	250,36 ± 135,94 (-45,00%)
Количество клеток с очагами	55,66 ± 37,00	76,79 ± 25,57*	68,90 ± 43,19 (23,79%)	96,00 ± 32,79 (25,01%)*	68,79 ± 41,12 (23,61%)	97,28 ± 38,43 (26,67%)*	60,00 ± 53,32 (7,81%)	89,34 ± 53,29 (16,34%)*
Общее количество очагов	167,17 ± 219,72	288,10 ± 251,77*	241,69 ± 329,02 (44,58%)	492,34 ± 428,49 (70,89%)	200,38 ± 213,00 (19,86%)	718,62 ± 541,01 (149,43%)	162,55 ± 200,66 (-2,76%)	658,79 ± 507,66 (128,67%)
Среднее значение интенсивности для всех очагов	69,88 ± 17,97*	302,94 ± 81,62	73,11 ± 16,25 (4,62%)*	315,55 ± 85,46 (4,16%)	64,96 ± 13,60 (-7,05%)*	278,64 ± 100,81 (-8,02%)	61,67 ± 9,45 (-11,75%)*	232,85 ± 84,27 (-23,14%)
Количество обнаруженных кластеров	0,24 ± 0,79	49,34 ± 80,94*	0,34 ± 1,08 (42,86%)	75,52 ± 124,35 (53,04%)*	0,14 ± 0,58 (-42,86%)	177,03 ± 141,17 (258,77%)*	0,07 ± 0,26 (-71,43%)	124,34 ± 113,04 (151,99%)*
Среднее количество очагов в клетке	1,45 ± 1,58	2,81 ± 2,96*	2,01 ± 1,92 (38,34%)	4,28 ± 2,73 (52,63%)*	1,78 ± 1,56 (22,70%)	6,05 ± 3,36 (115,46%)*	1,31 ± 1,25 (-10,05%)	6,43 ± 3,57 (129,11%)*
Среднее значение всех очагов в клетке	1,46 ± 1,59	8,05 ± 13,26*	2,02 ± 1,93 (38,63%)	10,20 ± 13,13 (26,71%)*	1,79 ± 1,57 (22,58%)	37,47 ± 59,50 (365,48%)*	1,31 ± 1,26 (-10,20%)	17,52 ± 16,10 (117,66%)*
Процент поврежденных клеток	51,13 ± 29,87	70,38 ± 23,74*	62,01 ± 29,51 (21,27%)	86,70 ± 12,73 (23,19%)*	61,71 ± 29,63 (20,68%)	87,17 ± 17,30 (23,86%)*	50,17 ± 30,52 (-1,89%)	84,81 ± 22,83 (20,51%)*
Среднее значение всех очагов в кластере с низкой интенсивностью	2,45 ± 1,81	3,17 ± 2,83*	3,19 ± 2,20 (30,10%)	4,53 ± 2,69 (42,76%)*	3,11 ± 1,92 (26,76%)	6,27 ± 3,33 (97,41%)*	2,22 ± 1,64 (-9,40%)	6,67 ± 3,56 (110,09%)*

Продолжение таблицы 17

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Процент ядер с очагами в кластерах с низкой интенсивностью	72,46 ± 27,92	81,74 ± 16,52*	81,74 ± 17,92 (12,80%)	89,85 ± 12,17 (9,93%)*	83,33 ± 18,95 (15,00%)	89,65 ± 14,79 (9,69%)*	71,06 ± 27,13 (-1,94%)	87,21 ± 23,26 (6,69%)*
* - p<0,05								

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%.

Таким образом, полученные нами результаты анализа очагов γ -H2AX в канале разрывов FITC свидетельствуют, что два показателя «Среднее значение интенсивности для всех очагов» и «Количество перекрывающихся очагов в двух каналах» показали статистически достоверную разницу при сравнении основной и контрольной группы, но также, значимо различались в зависимости от проведенных курсов ХТ.

Большое количество показателей, имеющих статистическую значимость, в канале репарации APC («Количество клеток с очагами», «Общее количество очагов», «Количество обнаруженных кластеров», «Среднее количество очагов в клетке», «Среднее значение всех очагов в клетке», «Процент поврежденных клеток», «Среднее значение всех очагов в кластере с низкой интенсивностью», «Среднее значение всех очагов в кластере с низкой интенсивностью в кластере», «Процент ядер с очагами в кластерах с низкой интенсивностью») демонстрируют усиление процесса репарации, подтверждая реакцию организма на проведение ХТ. Выявленные нами статистически значимые параметры в канале разрывов FITC и канале репарации APC могут служить биомаркером ответа на проводимую химиотерапию у больных РМЖ.

4 ОБСУЖДЕНИЕ

Наше исследование по изучению распространенности и генетического профиля рака молочной железы включало 3 основных этапа. Первым было проведение оценки распространенности рака молочной железы в Актюбинской области за 6 лет (2014-2018гг. и 2022г.). На втором этапе осуществлено генетическое исследование стандартной панели 8 мутации генов BRCA1 и BRCA2 (n=278) методом ПЦР, а также NGS секвенирование 113 кандидатных генов с проведением биоинформационного анализа у больных раком молочной железы (n=149 этнические казашки). На третьем этапе изучена оценка ответа на химиотерапию методом мониторинга двухцепочечных разрывов ДНК (γ -H2AX) в лимфоцитах пациенток с РМЖ на автоматизированной системе AKLIDES.

Исследование по выявлению РМЖ проведено по данным Электронного регистра онкологических больных по Актюбинской области за 2014-2018гг. и 2022г. Всего зарегистрировано 1023 новых случаев РМЖ.

Заболеваемость раком молочной железы в мире стремительно растет практически повсеместно, особенно в развивающихся странах [174]. Хотя заболеваемость в азиатских странах ниже, чем в европейских и американских (заболеваемость увеличилась в Индии и Японии), рост смертности от рака молочной железы в Азии значителен по сравнению со странами Европы и Америки (примерно 6-23 на 100 000) [175,176]. Большая часть научной литературы поддерживает мнение о том, что недавний рост заболеваемости раком молочной железы среди азиатских женщин в Азии обусловлен экономическим развитием и адаптацией к более «западному» образу жизни, включая отсроченные роды, снижение паритета родов и грудного вскармливания, снижение массы тела, прирост и увеличение потребления животного жира [177-182].

По данным авторов Chukmaitov A.S. et al. (2018) рак молочной железы является наиболее часто диагностируемым видом рака у казахстанских женщин [183,184]. Наша страна вкладывает значительные инвестиции для улучшения здоровья и продолжительности жизни своего населения, и снижение относительно высокой смертности от РМЖ остается приоритетом для страны. С 2008 года в Казахстане действует программа скрининга рака молочной железы. Женщинам от 50 лет до 70 лет каждые 2 года проводят маммографию с двукратной четкостью. Это способствовало повышению выявляемости РМЖ. С 2018 г. маммографию проводят с 40 лет, учитывая рост заболеваемости у молодых женщин [185]. Внедрение программы маммографии способствовало раннему выявлению РМЖ, что также подтверждается результатами нашего исследования.

Показатели выживаемости различаются по всему миру: она выше в развитых странах по сравнению с менее развитыми. Например, 5-летняя выживаемость в развитых странах, таких как США и Великобритания, находилась в диапазоне 85–90% в период с 2017 по 2019 год [186,187]. В развивающихся странах этот показатель колеблется в пределах 40–60% [188,

189], в нашей стране по данным CONCORD Programe 5-летняя выживаемость составила 51,4% [190], аналогично данным проведенного нами исследования 51,6% (95%ДИ: 50,45-52,89).

Поскольку, мы выявили высокую выявляемость РМЖ у женщин Актюбинской области, было решено изучить генетический профиль больных РМЖ.

Нами была инициирована работа по определению 8 полиморфизмов генов BRCA1 и BRCA2 по стандартным диагностическим панелям у пациенток с раком молочной железы в Актюбинской области. Данная работа проведена в рамках финансируемого проекта МОН РК «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 №: 0118РК01065, руководитель – Жексенова А.Н., ЗКМУ им.М.Оспанова). В нашем исследовании из 278 больных РМЖ по методу ПЦР было выявлено 3 случая мутации. У 2 пациенток обнаружен полиморфизм гена BRCA1 – с.5266dupC (5382insC) 0,72 % (95% ДИ 0.27-1.71) и у одной пациентки 300T>G (Cys61Gly) 0,36% (95% ДИ 0.34-1.06).

По данным Gray F (2018) «приблизительно 5-10% пациентов с впервые диагностированным раком молочной железы имеют семейный анамнез рака молочной железы или рака яичников [191], что указывает на роль генетической или негенетической наследственности в развитии рака молочной железы». Общий риск рака молочной железы увеличивается, если у ближайших родственников рак молочной железы/яичников развивается в более молодом возрасте. Даже у женщин без общих мутаций 10-летний абсолютный риск развития рака молочной железы достигает 14,1%, если у них есть родственники первой линии, у которых рак молочной железы развился в возрасте до 40 лет. Риск еще выше, когда женщины положительны на BRCA1/2 или другие распространенные генетические мутации [192]. Из обследованных нами пациенток семейный анамнез был положительным у 33 женщин (11,8%).

Выявленная у двух наших пациенток мутация BRCA1 – с.5266dupC (5382insC) является второй наиболее часто регистрируемой мутацией в экзоне 20 BRCA1 по базе данных BIC. Она наиболее распространена в Центральной и Восточной Европе. Эта одиночная мутация с различной частотой обнаруживается в семьях с высоким риском рака молочной железы и/или яичников таблица 18. Она практически отсутствует в Испании и Португалии и с низкой частотой встречается в Нидерландах, Бельгии и скандинавских странах [193]. Проведенное исследование в Восточном регионе Казахстана выявило мутации генов BRCA1 (5382insC (7,7%), с.2311T>C (22,4%), с.4308T>C (8,8%)) и TP53 (rs1042522 (16,4%)) [64,с. 5]. Исследователи связывают высокую частоту полиморфизма генов BRCA1 (5382insC) при семейном РМЖ с проведенными испытаниями на ядерном полигоне Семипалатинска.

Таблица 18 - Частота мутации в гене BRCA1 (5382insC) в разных странах

Страна	Частота (%)	ссылка
Польша	3,3%	[194]
Россия	41%	[195]
Венгрия	10%	[196]
Словения	13 %	[197]
Еврей-ашкенази	10,3%	[198]
Греция	1,3%	[199]
Германия	4%	[200]
Италия	9%	[201]
Восточный Казахстан	7,7%	64
Наше исследование	0,72%	-

В нашем исследовании были использованы стандартные диагностические панели тестирования мутации генов, представленные российскими исследователями [202].

Использование «стандартных» диагностических панелей, дающих возможность определять насколько наиболее распространенные в популяции мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 могут привести к появлению ложноотрицательных результатов из-за наличия других повреждений в кодирующих областях данных генов. С другой стороны, при использовании данной панели мы выявили только 3 случая мутации генов BRCA1 у 278 женщин с РМЖ. Возможно риск появления РМЖ у женщин Актюбинской области связан с полиморфизмами других генов. Поэтому 2 Б этапом нашего исследования явилось проведение секвенирования кандидатных генов с использованием технологии NGS (Next generation sequencing, Illumina) секвенирования у женщин казашек с раком молочной железы в Актюбинской области, а также молекулярно-генетическое генотипирование с применением технологии чип-систем и биоинформационный анализ.

В нашем исследовании случай-контроль мы изучили 113 полиморфизмов у больных с РМЖ и условно здоровых женщин (контроль).

Нами впервые выявлены 28 статистически значимых полиморфизмов, ассоциированных с риском развития РМЖ, из них в каталог GWAS входили 7 рискованных статистически значимых полиморфизмов: RARG (Rs2229774), FGFR2 (Rs2981582), ATM (Rs1800057), MAP3K1 (Rs889312), BRCA2 (Rs11571833), FGFR2 (Rs7895676), FGFR2 (Rs1219648). В таблице 19 представлены основные характеристики выявленных нами 28 полиморфизмов, ассоциированных с риском развития РМЖ у женщин Актюбинской области.

Таблица 19 - Характеристика 28 выявленных полиморфизмов, ассоциированных с риском развития РМЖ у женщин Актюбинской области

№	Полиморфизм	Ген	Описание	Наличие в GWAS каталог	Применение	Ссылка
1	2	3	4	5	6	7
1	Rs55886062	DPYD	Дигидропиримидинд егидрогеназы	Нет	Ответ на фторпиримидин	[203]
2	Rs3918290	DPYD	Дигидропиримидинд егидрогеназы	Да	Токсичности капецитабина	[204]
3	Rs12721655	СYP2B6	Цитохром P450 2B6	Нет	Токсичность доксорубицина и циклофосфамида	[205]
4	Rs4987117	BRCA2	BReast CAncer 2	Нет	РМЖ	[206]
5	Rs2229774	RARG	Рецептор ретиноевой кислоты гамма	Да	Антрациклин-индуцированная кардиотоксичность при раке у детей	[207]
6	Rs11203289	SDHB	Сукцинатдегидрогеназы	Нет	Синдроме Каудена	[208]
7	Rs16942	BRCA1	BReast CAncer 1	Нет	РМЖ	[209]
8	Rs34945627	TNFRSF11A	Представитель 11а надсемейства рецепторов TNF	Нет	РМЖ	[210]
9	Rs11571747	BRCA2	BReast CAncer 2	Нет	Рак поджелудочной железы	[211]
10	Rs137852576	AR	Рецептор андрогена	Нет	РМЖ у мужчин	[212]
11	Rs11571833	BRCA2	BReast CAncer 2	Да	РМЖ	[213]
12	Rs80359062	BRCA1	BReast CAncer 1	Нет	РМЖ у мужчин	[214]
13	Rs3218536	XRCC2	X-Ray Repair Cross-Complementing Group 2	Нет	РМЖ	[215]
14	Rs80357382	BRCA1	BReast CAncer 1	Нет	РМЖ	[216]
15	Rs28934577	TP53	Клеточный опухолевый антиген p53	Нет	РМЖ	[217]

Продолжение таблицы 19

1	2	3	4	5	6	7
16	Rs2981582	FGFR2	Рецептор фактора роста фибробластов 2	Да	РМЖ	[218]
17	Rs137852985	BRIP1	С-концевая геликаза 1, взаимодействующая с BRCA1	Нет	РМЖ	[99. с]
18	Rs1800057	ATM	Серин/треонинкиназа ATM	Да	Множественный рак	[219]
19	Rs3092856	ATM	Серин/треонинкиназа ATM	Нет	РМЖ	[220]
20	Rs1800058	ATM	Серин/треонинкиназа ATM	Нет	РМЖ	[221]
21	Rs1799950	BRCA1	BReast CAncer 1	Нет	РМЖ	[222]
22	Rs1799954	BRCA2	BReast CAncer 2	Нет	РМЖ	[223]
23	Rs889312	MAP3 K1	Митоген-активируемая белковая киназа киназы киназы 1	Да	РМЖ	[224]
24	Rs1787991	CHEK2	Чекпойнт-киназы 2	Нет	РМЖ	[225]
25	Rs3918242	MMP-9	Матриксной металлопротеиназы-9	Нет	Инсульт	[226]
26	Rs62625308	BRCA1	BReast CAncer 1	Нет	РМЖ	[227]
27	Rs757229	GPx4	Фосфолипидгидропероксидглутатионпероксидазы	Нет	Мужское бесплодие	[228]
28	Rs7895676	FGFR2	Рецептор фактора роста фибробластов 2	Да	РМЖ	[229]

Исследование дизайна случай-контроль позволяет сопоставить ассоциативную связь риска развития РМЖ отдельно взятых полиморфизмов с известными литературными данными о вкладе генов в развитие указанной патологии. Проведение биоинформационного анализа важно для определения особенностей влияния полиморфизма и ассоциации разных генотипов на риск развития РМЖ. Отношение шансов (ОШ) определено в зависимости от модели наследования (кодминантной, доминантной, рецессивной, сверхдоминантной и лог-аддитивной). Данные 5 моделей наследования показывают варианты наследования «генотип-фенотип». Кодминантная модель – отдельные сравнения гетерозиготного и вариантного гомозиготного с референтным гомозиготным. Доминантная – объединенное сравнение гетерозиготного и вариантного гомозиготного с референтным гомозиготным. Рецессивная –

объединенное сравнение гетерозиготного и референтного гомозиготного с вариантным гомозиготным. Сверхдоминантная – объединенное сравнение двух гомозиготных генотипов с гетерозиготным. Лог-аддитивная – отдельные сравнения одного и двух вариантных аллелей с референтным [230].

По 5 моделям наследования наиболее высокие шансы развития РМЖ были установлены у следующих полиморфизмов: в кодоминантной модели полиморфизм - rs2981582 гена FGFR2 (вариация common) генотипы A/G и A/A (ОШ=19.15, 95% ДИ:9.08-40.35, P=0 и ОШ=16.82, 95% ДИ: 6.62-42.74, P=0); в доминантной модели генотипы A/G-A/A (ОШ=18.62, 95%ДИ 9-38.51, P=0); в рецессивной модели генотип A/A (ОШ=2.28, 95%ДИ 1.12-4.63, P=0); сверхдоминантной модели генотип A/G (ОШ=6, 95%ДИ 3.58-10.09, P=0). Высокая вероятность наследования РМЖ подтверждена и вариации minor в сверхдоминантной модели генотип A/G (ОШ=6, 95%ДИ 3.58-10.09).

Исследования Jin Shu. (2019) подтверждают связь полиморфизма FGFR2 rs2981582 с РМЖ в азиатской популяции. Логистический регрессионный анализ выявил, что генотипы TT и TC и доминантный тип достоверно коррелировали с развитием РМЖ (ОШ=1,21, 95% (ДИ): 1,050–2,27; ОШ=1,81, 95% ДИ: 1,24–2,73; ОШ=2,15, 95% ДИ: 1,25–5,31) соответственно [231]. Проведены исследования по валидации некоторых SNP в российской популяции, в частности, Боярских У. А. и соавт. выявили ассоциацию полиморфизма rs2981582 в гене FGFR2 с развитием РМЖ в Западной Сибири, OR=1,46 (95% CI 1,30–1,62, p=2 *10⁻⁶) [232].

Нами было определено что, полиморфизм rs2229774 гена RARG (вариация common) повышает риск развития РМЖ в кодоминантной модели по генотипу A/G (ОШ 19.47, 95%ДИ 10.56-35.91, P=0); в доминантной модели по генотипу A/G-A/A (ОШ=18.44, 95%ДИ 10.09-33.7, P=0); в сверхдоминантной модели A/G (ОШ=19.62, 95%ДИ 10.64-36.17, P=0). Полиморфизм rs137852985 (вариация common) в кодоминантной модели генотип T/C (ОШ=53.58, 95%ДИ 22.72-126.32, P=0); в доминантной модели генотипы T/C-T/T (ОШ=39.56, 95%ДИ 18.61-84.1, P=0); в сверхдоминантной модели генотип T/C (ОШ=24.41, 95%ДИ 12.3-48.46). Однако, в доступных нам литературных источниках исследовании по взаимосвязи миссенс вариантов полиморфизмов RARG с развитием РМЖ найдено не было. Известно, что в первом опубликованном каталоге GWAS по сердечной недостаточности, вызванной антрациклином, наиболее значимым полиморфизмом был миссенс-вариант в RARG (Ser427Leu TCG>TTG, rs2229774) [233]. Проведено проспективное когортное исследование, в котором оценивалась возможность комбинированного тестирования на RARG rs2229774, SLC28A3 rs7853758 и UGT1A6.*4 rs17863783, для прогнозирования кардиотоксичности, связанной с доксорубицином, у большой когорты пациентов с одинаковыми диагнозами [234].

Наши результаты выявили, что полиморфизм rs889312 гена MAP3K1 (вариация common) увеличивают риск развития РМЖ в доминантной модели наследования – генотипы A/C-C/C (ОШ=1.78, 95%ДИ 1.04-3.06, P=0.003); в рецессивной модели – генотип C/C (ОШ=2.17 95%ДИ 1.19-3.95). Данные

результаты согласуются с исследованиями Abbasi (2022), где обнаружено, что полиморфизм rs889312 гена MAP3K1 ассоциируется с раком молочной железы у пакистанских женщин. ОШ составило 0,55 (95%ДИ 0,31–0,96) для гомозиготного AA дикого типа; ОШ=1,30 (95% ДИ 0,74–2,26) для гетерозиготного AC; ОШ=7,06 (95% ДИ 1,23–40,34) для гомозиготного CC с редким аллелем [224,с. 6].

Сила ассоциации с заболеваемостью РМЖ для rs889312 была хорошо задокументирована в популяциях Восточной Азии, Северной Африки и Северного полушария. Эти исследования были проведены у пациентов с раком молочной железы для определения вероятности SNP, связанных с развитием и/или прогрессированием заболевания. Сильная ассоциация SNP наблюдалась в исследовании GWAS, проведенном Easton et al. 2007 г. [96,с. 8], и в исследование были включены 3882 пациента с раком молочной железы из Европейской сети передового опыта по борьбе с раком с использованием популяционных регистров и биобанка (CCPRB) [235]. Предыдущий метаанализ, проведенный для проверки связи rs889312 с опасностью рака молочной железы, показал, что rs889312 был связан с более высоким риском рака молочной железы в малых и больших моделях популяций [236]. В исследованиях Jara L. (2013) отмечается, что rs889312 показал связь с риском развития рака молочной железы в Латинской Америке [237]. Кроме того, было обнаружено, что вариантный генотип MAP3K1 rs889312 связан с более крупными опухолями молочной железы у азиатов, но не у европейцев [238].

Данные метаанализа Heng Q. (2014) показали, что «полиморфизм гена MAP3K1 (rs889312) связан с риском рака молочной железы у европейцев и азиатов (как и в нашем исследовании), в то время как rs16886165 – фактор риска рака молочной железы у азиатских и африканских женщин, и оба могут служить маркерами предрасположенности к раку молочной железы» [239].

По одному полиморфизму гена AR в доступной нами литературе сведения о ассоциации с РМЖ не найдено.

При однофакторном прогнозировании риска развития РМЖ выявлены ТОП – 32 статистически значимых фактора с повышением уровней рисков 69,7% до 90,6%, из них наиболее важные являются: «Rs137852985 (TC, TT)», «Rs2229774 (AG, AA)» и «Rs2981582 (AG, AA)». При формировании прогнозной модели (Дерево решения) определены основные высоко рисковые классы развития РМЖ с уровнем риска 95,8%: «Возраст, лет <54,0», «Rs2229774 (AG)» и «Rs889312 (AA, CC)». Прогнозное качество построенной модели имеет высокий уровень.

Выявленные полиморфизмы генов (Rs2229774 гена RARG, Rs2981582 гена FGFR2, Rs1800057 гена ATM, Rs889312 гена MAP3K1, Rs11571833 гена BRCA2, Rs7895676 гена FGFR2, Rs1219648 гена FGFR2, Rs137852985 гена BRIP1), ассоциированных с риском развития рака молочной железы у казашек Актюбинской области связаны с повреждением ДНК, которые лежат в основе неопластических процессов. В связи с этим для нас представлял интерес изучение двухнитевых разрывов ДНК у больных РМЖ.

Повреждение ДНК и стабильность генома являются хорошо известными факторами, связанными с переходом нормальных тканей в предраковые и далее в злокачественные состояния. Очаги γ -H2AX, как маркер геномной нестабильности, могут функционировать в качестве маркера образования и прогрессирования рака [240].

Автоматизированная оценка γ -H2AX с помощью автоматизированной системы AKLIDES сочетает в себе получение, обработку и анализ изображений. Reddig A. (2015) и соавторы продемонстрировали на автоматизированной системе AKLIDES, что подсчет очагов γ -H2AX (моноклеарных клетках периферической крови) может быть применен для мониторинга эффективности цитостатического лекарственного средства и модуляции множественной лекарственной резистентности [241].

Нами было проведено пилотное исследование для проверки возможности обнаружения двухцепочечных разрывов, представленные фокусами γ -H2AX, в крови человека с помощью автоматизированной флуоресцентной микроскопии и автоматизированной системы AKLIDES у больных с раком молочной железы. Анализ очагов γ -H2AX мы проводили на моноклеарных клетках периферической крови (лимфоциты) у 29 больных с впервые верифицированным раком молочной железы, получавших неoadъювантную химиотерапию, и у 24 женщин контрольной группы с верифицированным доброкачественным диагнозом молочных желез.

В исследовании Beili Wang (2019) сообщается о высокой положительной частоте γ -H2AX в опухолевых клетках, по сравнению с нормальными тканями молочной железы у тех же больных с РМЖ. Значительная разница в опухолевых и соседних здоровых тканях демонстрирует, что γ -H2AX может помочь повысить эффективность ранней диагностики [242]. Brunner и соавт. продемонстрировали гораздо более высокую экспрессию γ -H2AX в карциномах эндометрия, чем в соседних доброкачественных эпителиальных поражениях [243].

Однако эти исследования проведены в тканях, а в большинстве случаев сбор образцов опухоли является сложной медицинской процедурой, особенно когда требуются повторные образцы. Поэтому врачам часто приходится обращаться к более безопасным, менее инвазивным процедурам, которые можно рутинно использовать в клинике и которые помогут оценить реакцию на терапию, а также обеспечить получение воспроизводимых результатов. В связи с этим, мы использовали более безопасный метод обнаружения очагов γ -H2AX моноклеарных клетках периферической крови у больных с РМЖ на автоматизированной системе AKLIDES.

Полученные нами результаты анализа очагов γ -H2AX показали статистически значимую разницу в основной и контрольной группах. В канале разрывов «FITC» показатель «Средний диаметр ядра» был выше чем в контрольной группе ($p=0,0382$). Показатель «Количество перекрывающихся очагов в двух каналах» в основной группе оказалось выше чем в контрольной группе ($p=0,0486$). Показатель «Среднее значение интенсивности для всех

очагов» был ниже в группе РМЖ ($p=0,0166$) (таблица 11). В канале репарации «АРС» показатель «Ядра с повышенной интенсивности свечения» в основной группе был ниже, чем контрольной группе ($p=0,0166$). В основной группе показатель «Среднее значение интенсивности для всех очагов» в канале разрывов и репарации ниже чем в контрольной группе ($p=0,0118$) (таблица 12).

Таким образом, нами выявлено различие в очагах γ H2АХ в лимфоцитах периферической крови у пациенток РМЖ и женщин с доброкачественными заболеваниями МЖ, аналогичные данным исследования Beili Wang (2019) проведенным на тканях молочной железы.

Далее мы определили 12 факторов влияющих на риск возникновения рака молочной железы (показатель «РМЖ,+»). Наиболее значимыми факторами риска развития РМЖ были «Возраст $\geq 48,0$ », «Среднее значение интенсивности для всех очагов $< 341,6$ » и «Возрастные группы (После 50 лет)» (таблица 13). Прогностическая модель оценки анализа очагов γ -H2АХ 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).

Лечение рака можно улучшить при доступности информации об ответах отдельных пациентов на определенные протоколы ХТ. Клиническая эффективность химиотерапии определяется по уменьшению размера опухоли и по медиане выживаемости. Однако в настоящее время реакция пациентов на лечение может быть неопределенной в течение нескольких недель, пока размер опухоли не будет оценен с помощью различных методов визуализации. Согласно одному из критериев, RECIST (основа критериев оценки ответа на солидную опухоль), уменьшение диаметра опухоли на 30% считается частичным ответом [244].

Для изучения ответа организма на проведение химиотерапии в режиме реального времени мы провели анализ динамики показателей по двум каналам разрывов FITC и репарации APC. Полученные нами результаты продемонстрировали, что после 1-го курса химиотерапии (2 этап) были значительные изменения двух показателей по каналу разрывов «FITC»: «Среднее значение интенсивности для всех очагов» ($p=0,0075$) и «Количество перекрывающихся очагов в двух каналах» ($p=0,0237$) (таблица 15). Наши данные свидетельствует о реакции организма на проведение 1-го курса химиотерапии в режиме реального времени.

В канале репарации «АРС» выявлена реакция девяти показателей на проведение ХТ: 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 ($p=0,0021$) (таблица 16).

Наиболее значимые колебания уровней очагов наблюдались перед 2-м курса ХТ, которые говорят об ответе организма на проводимую химиотерапию, проявляющиеся усилением процесса репарации разрывов ДНК у пациенток с РМЖ. Хотя по данным Треннера с соавторами высокие показатели репарации могут быть одной из причин плохого ответа на проводимую химиотерапию [245] – «повышенная способность репарации ДЦР является основной причиной радио- и химиорезистентности и, в конечном счете, рецидива рака [245,с. 7]. Однако, у наших пациенток несмотря на повышенные показатели по каналу репарации APC во время получения химиотерапии процент трех-летней выживаемости составил 85%. Требуется более длительный период наблюдения за пациентками. Таким образом, изменения показателей в каналах разрывов FITC и репарации APC могут служить биомаркерами ответа на проводимую химиотерапию у больных с раком молочной железы в режиме реального времени. Выявленные нами изменения определенных параметров очагов γ -H2AX в каналах разрывов FITC и репарации APC могут являться ответом организма на химиотерапию в режиме реального времени.

Поскольку наше исследование является пилотным проектом, мы понимаем, что оно имеет некоторые ограничения и лимиты

1. отсутствие стандартной методики проведения исследования
2. нами не проводилось исследования отдаленных результатов
3. использовалась малая, удобная выборка
4. отсутствие стандартных референсных показателей, позволяющих интерпретировать результаты и делать заключения.

ДЦР ДНК являются персонифицированным ответом организма на определенные факторы риска, поэтому могут варьировать индивидуально, и это может создавать препятствия для валидации на основе населения и определения прогностических пороговых значений. Как и любой другой биомаркер, γ H2AX имеет биологическую изменчивость, которая может быть предсказуемой, циклической [246].

Отсутствие экспериментальной стандартизации анализа γ H2AX приводит к широкой неоднородности полученных результатов и проблемам в их интерпретации, что затрудняет его использование в качестве рутинного биомаркера в популяционных исследованиях, поэтому необходимы дальнейшие исследования для стандартизации результатов. Также необходимо строгая организация исследования и индивидуальное обучение персонала [247].

По утверждению Zhang [248], что «лабораторная медицина направлена на предоставление тестов для принятия клинических решений». Наше пилотное исследование мониторинга очагов γ H2AX является первоначальным этапом для разработки неинвазивного метода определения эффективности химиотерапии РМЖ. Полученные нами результаты вызывают непосредственный интерес, и требуют дальнейших исследований по применению мониторинга очагов γ H2AX в качестве потенциального прогностического неинвазивного биомаркера по выявлению новообразования и ответа на химиотерапию в режиме реального времени.

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.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные данные могут служить основой для расширения методов ранней диагностики и профилактики рака молочной железы. Результаты генетического исследования расширят возможности национальной скрининговой программы по новообразованиям РМЖ и повысят эффективность мероприятий по профилактике данного заболевания в Западном Казахстане. Рекомендуется проводить генотипирование полиморфизма генов (ATM (rs1800057), RARG (rs2229774), BRCA2 (rs11571833), MAP3K1 (rs889312), FGFR2 (rs2981582) BRIP1 (Rs137852985) ассоциированных с риском развития рака молочной железы женщинам казахской национальности (скринингового возраста) семейным анамнезом в Актюбинской области в рамках персонифицированной медицины.

2. Рекомендуется внедрить в региональный протокол диагностики и лечения рака молочной железы проведение анализа очагов γ -H2AX в качестве биомаркера определения рака молочной железы и ответа на химиотерапию у больных РМЖ II-III стадией на основе инновационного подхода с применением автоматизированной системы «AKLIDES». Настоящее исследование представляет практический интерес для изучения ответа организма на проведение химиотерапии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Ginsburg O., Bray F., Coleman M.P. et al. The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health // *Lancet*. – 2017. – Vol. 389. - P. 847-60.
- 2 Breast Source: Globocan. – 2022
<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf> 12.09.2021.
- 3 Kazakhstan Source: Globocan. – 2022.
<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/398-kazakhstan-fact-sheets.pdf> 11.08.2021.
- 4 Allemani C., Matsuda T., Di Carlo V. et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries // *Lancet*. – 2018. – Vol. 391, №10125. - P. 1023-1075.
- 5 Roberts E., Howell S., Evans D.G. Polygenic risk scores and breast cancer risk prediction // *Breast*. – 2023. – Vol. 67. - P. 71-77.
- 6 Лаптиев С.А., Корженевская М.А., Соколенко А.П., Иевлева А.Г., Имянитов Е.Н. Медико-генетическое консультирование при наследственных формах рака молочной железы и рака яичников // *Учёные записки Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова*. – 2018. – №25(2). - С. 7-18.
- 7 De Silva S., Tennekoon K.H., Karunanayake E.H. Overview of the genetic basis toward early detection of breast cancer // *Breast Cancer (Dove Med Press)*. – 2019. – Vol. 11. - P. 71-80.
- 8 Madhusudan S., Middleton M.R. The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer // *Cancer Treat Rev*. – 2005. – Vol. 31. - P. 603-617.
- 9 Verma M., Maruvada P., Srivastava S. Epigenetics and cancer // *Crit Rev Cl Lab Sci*. – 2004. – Vol. 41. - P. 585-607.
- 10 Shakyawar S.K., Mishra N.K., Vellichirammal N.N. et al. A Review of Radiation-Induced Alterations of Multi-Omic Profiles, Radiation Injury Biomarkers, and Countermeasures // *Radiat Res*. – 2023. – Vol. 1, №199(1). - P. 89-111.
- 11 Penninckx S., Pariset E., Cekanaviciute E., Costes S.V. Quantification of radiation-induced DNA double strand break repair foci to evaluate and predict biological responses to ionizing radiation // *NAR Cancer*. – 2021. – Vol. 22, №4. - P. 46.
- 12 Burma S., Chen B.P., Murphy M. et al. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks // *J Biol Chem*. – 2001. – Vol. 276. - P. 42462-42467.
- 13 Rogakou E.P., Boon C., Redon C. et al. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo // *J Cell Biol*. – 1999. – Vol. 146. - P. 905-916.
- 14 Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H. et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139 // *J Biol Chem*. – 1998. – Vol. 273. - P. 5858-5868.

- 15 Porcedda P., Turinetti V., Orlando L. et al. Two-tier analysis of histone H2AX phosphorylation allows the identification of Ataxia Telangiectasia heterozygotes // *Radiother Oncol.* – 2009. – Vol. 92. - P. 133-137.
- 16 Rothkamm K., Lobrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2003. – Vol. 100. - P. 5057-5062.
- 17 Raavi V., Perumal V., Paul S. Potential application of γ -H2AX as a biodosimetry tool for radiation triage // *Mutat Res Rev Mutat Res.* – 2021. - №787. – P. 108350.
- 18 Bizzaro N., Antico A., Platzgummer S. et al. Automated antinuclear immunofluorescence antibody screening: a comparative study of six computer-aided diagnostic systems // *Autoimmun Rev.* – 2014. – Vol. 13. - P. 292-8.
- 19 Willitzki A., Hiemann R., Peters V. et al. New platform technology for comprehensive serological diagnostics of autoimmune diseases // *Clin Dev Immunol.* – 2012. – Vol. 3. - P. 284740.
- 20 Willitzki A., Lorenz S., Hiemann R. et al. Fully automated analysis of chemically induced γ H2AX foci in human peripheral blood mononuclear cells by indirect immunofluorescence // *Cytometry A.* – 2013. – Vol. 83. - P. 1017-26.
- 21 Ivashkevich A.N., Martin O.A., Smith A.J. et al. γ H2AX foci as a measure of DNA damage: a computational approach to automatic analysis // *Mutat Res.* – 2011. – Vol. 711. - P. 49-60.
- 22 Hiemann R., Büttner T., Krieger T. et al. Challenges of automated screening and differentiation of non-organ specific autoantibodies on HEp-2 cells // *Autoimmun Rev.* – 2009. – Vol. 9. - P. 17-22.
- 23 Runge R., Hiemann R., Wendisch M. et al. Fully automated interpretation of ionizing radiation-induced γ H2AX foci by the novel pattern recognition system AKLIDES® // *Int J Radiat Biol.* – 2012. – Vol. 88. - P. 439-447.
- 24 Torre L.A., Islami F., Siegel R.L., et al. Global Cancer in Women: Burden and Trends. // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2017. – Vol. 26, №4. - P. 444-457.
- 25 Vakili M., Pirdehghan A., Adimi M. et al. Epidemiology and trend of cancer in yazd, a central province of iran, 2005- 2009 // *J Res Health Sci.* – 2014. – Vol. 14. - P. 210-213.
- 26 Forman D., Bray F., Brewster D.H. et al. Cancer incidence in five continents volume x (IARC scientific publications // International Agency for Research on Cancer Lyon. – France; Lyon: IARC, 2014. - №164. – P. 504-644.
- 27 Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 // *Int J Cancer.* – 2015. – Vol. 136. - P. 359- 386.
- 28 Igissinov N., Igissinov S., Moore M.A. et al. Trends of prevalent cancer incidences in the Aral Sea area of Kazakhstan // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2011. – Vol. 12. - P. 2299-303.

- 29 Beysebeyev E., Bilyalova Z., Kozhakeeva L. et al. Spatial and temporal epidemiological assessment of breast cancer incidence and mortality in Kazakhstan, 1999-2013 // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2015. – Vol. 16. - P. 6795.
- 30 Shertaeva A., Ospanova D., Grjibovsky A. et al. Study on Breast Cancer in Kazakhstan Using the Functional Time Series // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2023. - №24(3). – P. 1037-1046.
- 31 Brisken C., O'Malley B. Hormone action in the mammary gland // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2010. – Vol. 2, №12. - P. 3178.
- 32 Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies // *Lancet Oncol.* – 2012. – Vol. 13, №11. - P. 1141-1151.
- 33 Román M., Sakshaug S., Graff-Iversen S. et al. Postmenopausal hormone therapy and the risk of breast cancer in Norway // *Int J Cancer.* – 2016. – Vol. 138, №3. - P. 584-593.
- 34 Newcomb P.A., Trentham-Dietz A., Hampton J.M. et al. Late age at first full term birth is strongly associated with lobular breast cancer // *Cancer.* – 2011. – Vol. 117, №9. - P. 1946-1956.
- 35 Roberti S., van Leeuwen F.E., Ronckers C.M. et al. Radiotherapy-Related Dose and Irradiated Volume Effects on Breast Cancer Risk Among Hodgkin Lymphoma Survivors // *J Natl Cancer Inst.* – 2022. – Vol. 9, №114(9). - P. 1270-1278.
- 36 Oze I., Ito H., Kasugai Y. et al. A Personal Breast Cancer Risk Stratification Model Using Common Variants and Environmental Risk Factors in Japanese Females // *Cancers.* – 2021. – Vol. 13. - P. 3796.
- 37 Nielsen F.C., van Overeem Hansen T., Sørensen C.S. Hereditary breast and ovarian cancer: New genes in confined pathways // *Nat. Rev. Cancer.* – 2016. – Vol. 16. - P. 599–612.
- 38 Human Genome Project Information Archive. – 1990–2003. https://web.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/index.shtml 12.06.2021.
- 39 Mahdavi M., Nassiri M., Kooshyar M.M. et al. Hereditary breast cancer; Genetic penetrance and current status with BRCA // *Cell Physiol.* – 2019. – Vol. 234, №5. - P. 5741-5750.
- 40 Clark A.S., Domchek S.M. Clinical management of hereditary breast cancer syndromes // *J Mammary Gland Biol and Neoplasia.* – 2011. – Vol. 15, №1. - P. 17–25.
- 41 Al-Moundhri M.S., Al-Ansari A., Al-Mawali K. et al. BRCA1 gene Molecular Alterations in Omani Breast Cancer Patients // *Gulf J Oncolog.* – 2013. – Vol. 1. - P. 45–51.
- 42 Marchina E., Fontana M.G., Speziani M. et al. BRCA1 and BRCA2 genetic test in high risk patients and families: counselling and management // *Oncol Rep.* – 2010. – Vol. 24. - P. 1661–1667.
- 43 Chen S., Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance // *Journal of Clinical Oncology.* – 2007. – Vol. 25, №11. - P. 1329-1333.

- 44 Mavaddat N., Antoniou A.C., Easton D.F. et al. Genetic susceptibility to breast cancer // *Mol Oncol.* – 2010. – Vol. 4, №3. - P. 174-191.
- 45 Apostolou P., Fostira F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes // *Biomed Res Int.* – 2013. – Vol. 2. - P. 1-11.
- 46 Mahdavi M., Nassiri M., Kooshyar M.M., Vakili-Azghandi M., Avan A., Sandry R., Pillai S., Lam A.K., Gopalan V. Hereditary breast cancer; Genetic penetrance and current status with BRCA // *J Cell Physiol.* – 2019. – Vol. 234, №5. - P. 5741-5750.
- 47 Antoniou A., Pharoah P.D., Narod S. et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies // *Hum Genet.* – 2003. – Vol. 72, №5. - P. 1117-1130.
- 48 Moynahan M.E., Chiu J.W., Koller B.H. et al. BRCA1 controls homology-directed DNA repair // *Mol Cell.* – 1999. – Vol. 4. - P. 511-518.
- 49 Scully R., Chen J., Plug A. et al. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells // *Cell.* – 1997. – Vol. 88. - P. 265-275.
- 50 Orban T.I. Emerging roles of BRCA1 alternative splicing // *Mol Pathol.* – 2003. – Vol. 56. - P. 191-197.
- 51 Stecklein S.R., Jensen R.A., Pal A. Genetic and epigenetic signatures of breast cancer subtypes // *Front Biosci (Elite Ed).* – 2012. – Vol. 4. - P. 934-949.
- 52 D'Andrea A.D. The Fanconi anaemia / BRCA pathway // *Nat Rev Cancer.* – 2003. – Vol. 3. - P. 23-34.
- 53 Albertsen H., Plaetke R., Ballard L. et al. Genetic mapping of the BRCA1 region on chromosome 17q21 // *Am J Hum Genet.* – 1994. – Vol. 54. - P. 516-525.
- 54 Wooster R., Neuhausen S.L., Mangion J. et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13 // *Science.* – 1994. – Vol. 265. - P. 2088-2090.
- 55 Bork P., Blomberg N., Nilges M. Internal repeats in the BRCA2 protein sequence // *Nat Genet.* – 1996. – Vol. 13. - P. 22-23.
- 56 Chen P.L., Chen C.F., Chen Y. et al. The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – Vol. 95. - P. 5287-5292.
- 57 Wong A.K., Pero R., Ormonde P.A. et al. RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene BRCA2 // *J Biol Chem.* – 1997. – Vol. 272. - P. 31941-31944.
- 58 Chen J., Silver D.P., Walpita D. et al. Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells // *Mol Cell.* – 1998. – Vol. 2. - P. 317-328.
- 59 Kadouri L., Hubert A., Rotenberg Y. et al. Cancer risks in carriers of the BRCA 1 Ashkenazi founder mutations // *J. Med. Genet.* – 2007. – Vol. 44. - P. 467-71.

- 60 Marchetty P., Di Ricco C.Z., Ricevuto E. et al. Reducing breast cancer incidence in familial breast cancer: overlooking the present panorama // *Ann. Oncol.* – 2004. – Vol. 15, №1. - P. 127-34.
- 61 National Human Genome. – 2021. Research Institute <https://www.genome.gov/> 25.08.2021.
- 62 Finkelman B.S., Rubinstein W.S., Friedman S. et al. Breast and Ovarian Cancer Risk and Risk Reduction in Jewish BRCA1/2 Mutation Carriers // *J Clin Oncol.* – 2012. - Vol. 15, №12. - P. 1321–1328.
- 63 Sokolenko A.P., Sokolova T.N., Ni V.I. et al. Frequency and spectrum of founder and non-founder BRCA1 and BRCA2 mutations in a large series of Russian breast cancer and ovarian cancer patients // *Breast Cancer Res Treat.* – 2020. – Vol. 184, №1. - P. 229-235.
- 64 Apsalikov B., Manambaeva Z., Ospanov E. BRCA1 and TP53 Gene-Mutations: Family Predisposition and Radioecological Risk of Developing Breast Cancer // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* – 2016. – Vol. 17, №8. - P. 4059-4062.
- 65 Breast cancer in young women of Kazakh population depending on germline mutations: Results of next-generation sequencing. – 2019. [https://www.annalsofoncology.org/article/S09237534\(19\)583740/fulltext#related](https://www.annalsofoncology.org/article/S09237534(19)583740/fulltext#related) 15.08.2021.
- 66 Жаппаров Е.И. Однонуклеотидные полиморфизмы в прогнозировании развития рака молочной железы в казахской популяции: дис. ... канд. мед. наук. - М., 2023. - 58 с.
- 67 Lynch H.T., Albano W.A., Danes B.S. et al. Genetic predisposition to breast cancer // *Cancer.* – 1984. – Vol. 53. - P. 612-622.
- 68 Loescher L.J., Whitesell L. The biology of cancer / in: Tranin AS, Masny A, Jenkins J, editors. Genetics in oncology practice: Cancer risk assessment // *Oncology Nursing Society.* – 2003. - №1. – P. 23–56.
- 69 Fries M.H., Holt C., Carpenter I. et al. Guidelines for evaluation of patients at risk for inherited breast and ovarian cancer: Recommendations of the Department of Defense Familial Breast/Ovarian Cancer Research Project // *Military Medicine.* – 2002. - Vol. 167, №2. - P. 93-98.
- 70 Daly M.B., Pal T., Berry M.P. et al. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology // *J Natl Compr Canc Netw.* – 2021. – Vol. 6, №19(1). - P. 77-102.
- 71 Hyman D.M., Taylor B.S., Baselga J. Implementing genome-driven oncology // *Cell.* – 2017. – Vol. 168. - P. 584-99.
- 72 Kandoth C., McLellan M.D., Vandin F. et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types // *Nature.* – 2013. – Vol. 502. - P. 333.
- 73 Berger M.F., Mardis E.R. The emerging clinical relevance of genomics in cancer medicine // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2018. – Vol. 15. - P. 353-365.
- 74 Peck R.W. The right dose for every patient: a key step for precision medicine // *Nat Rev Drug Discov.* – 2016. – Vol. 15. - P. 145-146.

- 75 MacArthur J., Bowler E., Cerezo M. et al. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog) // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – Vol. 45. - P. 896-901.
- 76 Grossman R.L., Heath A.P., Ferretti V. et al. Toward a shared vision for cancer genomic data // *N Engl J Med.* – 2016. – Vol. 375. - P. 1109-1112.
- 77 Landrum M.J., Lee J.M., Benson M. et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – Vol. 44. - P. 862-868.
- 78 Strande N.T., Riggs E.R., Buchanan A.H. et al. Evaluating the clinical validity of gene-disease associations: an evidence-based framework developed by the clinical genome resource // *Am J Hum Genet.* – 2017. – Vol. 100. - P. 895-906.
- 79 Zhang Y., Zeng X., Liu P. et al. Association between FGFR2 (rs2981582, rs2420946 and rs2981578) polymorphism and breast cancer susceptibility: a meta-analysis // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8. - P. 3454-3470.
- 80 Ellsworth R.E., Decewicz D.J., Shriver C.D. et al. Breast cancer in the personal genomics era // *Curr Genomics.* – 2010. – Vol. 11, №3. - P. 146-161.
- 81 NCC Network (2021) Genetic/familial high-risk assessment: breast, ovarian and pancreatic <https://www-nccn-org.proxy.library.vanderbilt.edu/> 14.02.2021.
- 82 Piccinin C., Panchal S., Watkins N. et al. An update on genetic risk assessment and prevention: the role of genetic testing panels in breast cancer // *Expert Rev Anticancer Ther.* – 2019. – Vol. 19, №9. - P. 787–801.
- 83 Thompson D., et al. Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers // *J. Natl Cancer Inst.* – 2005. – Vol. 97. - P. 813-822.
- 84 Meijers-Heijboer H., et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2*1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations // *Nature Genet.* – 2002. – Vol. 31. - P. 55-59.
- 85 Erkkö H., et al. A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families // *Nature.* – 2007. – Vol. 446. - P. 316-319.
- 86 Renwick A., et al. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles // *Nature Genet.* – 2006. – Vol. 38. - P. 873-875.
- 87 GWAS Catalog NHGRI-EBI Catalog of human genome-wide association studies <https://www.ebi.ac.uk/gwas/> 18.04.2021.
- 88 Austen B., Powell J.E., Alvi A. et al. Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL // *Blood.* – 2005. – Vol.106, №9. – P. 3175–3182.
- 89 Chen J. Ataxia telangiectasia-related protein is involved in the phosphorylation of BRCA1 following deoxyribonucleic acid damage (англ.) // *American Association for Cancer Research.* – 2000. – Vol. 60, №18. - P. 5037-5039.
- 90 Friedenson B. The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers // *BMC Cancer.* – 2007. – Vol. 7. - P. 152.
- 91 Ahmed M., Rahman N. ATM and breast cancer susceptibility // *Oncogene.* – 2006. – Vol. 25, №43. - P. 5906-5911.

- 92 FGFR2 fibroblast growth factor receptor 2 Homo sapiens (human).- 2023 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2263> 16.07.2021.
- 93 Moffa A.B., Tannheimer S.L., Ethier S.P. Transforming potential of alternatively spliced variants of fibroblast growth factor receptor 2 in human mammary epithelial cells // *Mol. Cancer Res.* – 2004. – Vol. 2. - P. 643-652.
- 94 Adnane J. et al. Bek and Flg, 2 receptors to members of the Fgf family, are amplified in subsets of human breast cancers // *Oncogene.* – 1991. – Vol. 6. - P. 659-663.
- 95 Jang J.H., Shin K.H., Park J.G. Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61. - P. 3541-3543.
- 96 Vinik B.S., Kay E.S., Fiedorek F.T. Mapping of the MEK kinase gene (Mekk) to mouse chromosome 13 and human chromosome 5 // *Mamm Genome.* – 1995. – Vol. 6. - P. 782-783.
- 97 Easton D.F., Pooley K.A., Dunning A.M. et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci // *Nature.* – 2007. – Vol. 447. - P. 1087-1093.
- 98 Garcia-Closas M., Hall P., Nevanlinna H. et al. Heterogeneity of breast cancer associations with five susceptibility loci by clinical and pathological characteristics // *PLoS Genet.* – 2008. – Vol. 4. - P. 1000054.
- 99 Thomas G., Jacobs K.B., Kraft P. et al. A multistage genome-wide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (RAD51L1) // *Nat Genet.* – 2009. – Vol. 41. - P. 579-584.
- 100 Moyer C.L., Ivanovich J., Gillespie J.L. et al. Rare BRIP1 Missense Alleles Confer Risk for Ovarian and Breast Cancer // *Cancer Res.* – 2020. – Vol. 15, №80(4). - P. 857-867.
- 101 Kuchenbaecker K.B., Hopper J.L., Barnes D.R. et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers // *JAMA.* – 2017. – Vol. 317. - P. 2402–2416.
- 102 Weber-Lassalle N., Hauke J., Ramser J. et al. BRIP1 loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer // *Breast Cancer Res.* – 2018. – Vol. 20. - P. 7.
- 103 Watson J. D. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid // *Nature.* – 1953. – Vol. 171, №4356. - P. 737-738.
- 104 Watson J. D. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid // *Nature.* – 1953. – Vol. 171, №4361. - P. 964-967.
- 105 Литвинов С.В. Основные пути репарации двойных разрывов ядерной геномной днк и взаимодействия между ними // *Цитология и генетика.* - 2014. - Т. 48, №3. - С. 64-77.
- 106 Rogakou E.P. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139 // *J Biol Chem.* – 1998. – Vol. 273, №10. - P. 5858-5868.

107 Ward J.F. DNA Damage and Repair / In: Glass W.A., Varma M.N. (eds) Physical and Chemical Mechanisms in Molecular Radiation Biology // Basic Life Sciences. – 1991. – Vol. 58. – P. 15-29.

108 Huang X., Halicka H.D., Traganos F. et al. Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis // Cell Proliferation. – 2005. – Vol. 38. - P. 223-243.

109 Darzynkiewicz Z., Huang X., Okafuji M. Detection of DNA strand breaks by flow and laser scanning cytometry in studies of apoptosis and cell proliferation (DNA replication) // Methods in Molecular Biology. – 2006. – Vol. 314. - P. 81–93.

110 Nishihara K., Shahane S.A., Xia M. Determination of histone H2AX phosphorylation in DT40 cells. In: Zhu, H, Xia, M(eds) High-throughput screening assays in toxicology (vol. 1473 of the series Methods in Molecular Biology). - New York: Humana Press, 2016. - P. 71–76.

111 Avondoglio D., Scott T., Kil W.J. High throughput evaluation of gamma-H2AX // Radiat Oncol. – 2009. – Vol. 4. - P. 31.

112 Heydenreich J., Otto C., Mayer F. et al. Reliability of a fully automated interpretation of gamma-H2AX foci in lymphocytes of moderately trained subjects under resting conditions // J Nutr Metab. – 2014. – Vol. 3. - P. 478324.

113 Danese E., Lippi G., Buonocore R. et al. Mobile phone radiofrequency exposure has no effect on DNA double strand breaks (DSB) in human lymphocytes // Ann Transl Med. – 2017. – Vol. 5, №13. - P. 272.

114 Heydenreich J., Otto C., Mayer F. et al. Reliability of a Fully Automated Interpretation of γ -H2AX Foci in Lymphocytes of Moderately Trained Subjects under Resting Conditions // J Nutr Metab. – 2014. – Vol. 5. - P. 478324.

115 Нурахова А.Д., Маймакова А.М., Абдилова Г.Б. Опыт применения аппарата «Акклидес» в Казахстане для диагностики системных аутоиммунных заболеваний // Вестник хирургии Казахстана. – 2019. – Т. 3. - С. 10-17.

116 Булегенова М.Г., Дунаева А., Салиева С.С., Ускенбаева А.А. Двучечечные разрывы и репарации днк при острых лейкозах // Онкология и радиология казахстана. – 2023. – Вып. 68, №2. – С. 22-27.

117 Khanna K.K., Jackson S.P. DNA double-strand breaks: Signaling, repair and the cancer connection // Nat Genet. – 2001. – Vol. 27. - P. 247-254.

118 Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks // Carcinogenesis. – 2002. – Vol. 23. - P. 687-696.

119 Jackson S.P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks //Carcinogenesis. – 2002. – Vol. 23, №5. - P. 687–696.

120 Sonoda E., Hochegger H., Saberi A. et al. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair // DNA Repair. – 2006. – Vol. 5, №9-10. - P. 1021-1029.

121 Tanaka T., Huang X., Halicka H. D. et al. Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents // Cytometry Part A. – 2007. – Vol. 71, №9. - P. 648-661.

122 Vilenchik M.M., Knudson A.G. Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer // Proceedings of the National

Academy of Sciences of the United States of America. – 2003. – Vol. 100, №22. - P. 12871-12876.

123 Takahashi A., Ohnishi T. Does γ H2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? // *Cancer Letters*. – 2005. – Vol. 229, №2. - P. 171-179.

124 Kastan M.B., Lim D.S. The many substrates and functions of ATM // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2000. - Vol. 1, №3. - P. 179-186.

125 Bakkenist C.J., Kastan M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation // *Nature*. – 2003. – Vol. 421, №6922. - P. 499-506.

126 Wang H., Wang M., Böcker W. et al. Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors // *Cell Physiol*. – 2005. – Vol. 202, №2. - P. 492-502.

127 Redon C.E., Nakamura A.J., Zhang Y.W. et al. Histone gammaH2AX and poly(ADP-ribose) as clinical pharmacodynamic biomarkers // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. – 2010. – Vol. 16. - P. 4532-4542.

128 Takagi K., Dexheimer T.S., Redon C. et al. Novel E-ring camptothecin keto analogues (S38809 and S39625) are stable, potent, and selective topoisomerase I inhibitors without being substrates of drug efflux transporters // *Molecular cancer therapeutics*. – 2007. – Vol. 6. - P. 3229-3238.

129 Cline S.D., Hanawalt P.C. Who's on first in the cellular response to DNA damage? // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2003. – Vol. 4. - P. 361-372.

130 Bau D.T., Mau Y.C., Ding S.L. et al. DNA double-strand break repair capacity and risk of breast cancer // *Carcinogenesis*. – 2007. – Vol. 28, №8. - P. 1726-1730.

131 Ralhan R., Kaur J., Kreienberg R. et al. Links between DNA double strand break repair and breast cancer: accumulating evidence from both familial and nonfamilial cases // *Cancer Lett*. – 2007. – Vol. 248, №1. - P. 1-17.

132 Parshad R., Sanford K.K. Radiation-induced chromatid breaks and deficient DNA repair in cancer predisposition // *Crit Rev Oncol Hematol*. – 2001. – Vol. 37, №2. - P. 87-96.

133 Rube C.E., Grudzenski S., Kuhne M. et al. DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing // *Clin Cancer Res*. – 2008. – Vol. 14, №20. - P. 6546-6555.

134 Herschtal A., Martin R.F., Leong T. et al. Bayesian approach for prediction of patient Radiosensitivity // *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. – 2018. – Vol. 102, №3. - P. 627-634.

135 Fernet M., Hall J. Genetic biomarkers of therapeutic radiation sensitivity // *DNA Repair*. – 2004. – Vol. 3, №8-9. - P. 1237-1243.

136 Chistiakov D.A., Voronova N.V., Chistiakov P.A. Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions

in radiotherapy-treated cancer patients // *Acta Oncol.* – 2008. – Vol. 47, №5. - P. 809-824.

137 Yin X., Mason J., Lobachevsky P.N. et al. Radiation therapy modulates DNA repair efficiency in peripheral blood mononuclear cells of patients with non-small cell lung Cancer // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* – 2019. – Vol. 103, №2. - P. 521-531.

138 Giunta S., Belotserkovskaya R., Jackson S.P. DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis // *The Journal of cell biology.* – 2010. – Vol. 190. - P. 197-207.

139 Nakamura A.J., Rao V.A., Pommier Y. et al. The complexity of phosphorylated H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks // *Cell Cycle.* – 2020. - Vol. 9. - P. 389-397.

140 Nelson G., Buhmann M., von Zglinicki T. DNA damage foci in mitosis are devoid of 53BP1 // *Cell Cycle.* – 2009. – Vol. 8. - P. 3379-3383.

141 Jackson S. P., Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease // *Nature.* – 2009. – Vol. 7267. - P. 1071-1078.

142 Hosoya N., Miyagawa K. Targeting DNA damage response in cancer therapy // *Cancer Sci.* – 2014. – Vol. 4. - P. 370-388.

143 Ohta S. Contribution of somatic mutations in the mitochondrial genome to the development of cancer and tolerance against anticancer drugs // *Oncogene.* – 2006. – Vol. 34. - P. 4768-4776.

144 Saki M., Prakash A. DNA damage related crosstalk between the nucleus and mitochondria // *Free Radic. Biol. Med.* – 2017. – Vol. 1. – P. 216-227.

145 Ray U., Raghavan S.C. Understanding the DNA doublestrand break repair and its therapeutic implications // *DNA Repair (Amst).* – 2021. – Vol. 106. – P. 103177.

146 Alhegaili A.S. Role of DNA Repair Deficiency in Cancer Development // *Pakistan J. Biol. Sci.* – 2023. – Vol. 26. – P. 15-22.

147 Broustas C.G., Lieberman HB. DNA damage response genes and the development of cancer metastasis // *Radiat Res.* – 2014. – Vol. 181, №2. – P. 111-130.

148 Bridges K.A., Hirai H., Buser C.A. et al. MK-1775, a novel wee1 kinase inhibitor, radiosensitizes p53-defective human tumor cells. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.* - 2011.

149 Guzi T.J., Paruch K., Dwyer M.P. et al. Targeting the replication checkpoint using SCH 900776, a potent and functionally selective CHK1 inhibitor identified via high content screening // *Molecular cancer therapeutics.* – 2011. – Vol. 10. - P. 591-602.

150 Karp J.E., Ricklis R.M., Balakrishnan K. et al. A phase 1 clinical-laboratory study of clofarabine followed by cyclophosphamide for adults with refractory acute leukemias // *Blood.* – 2007. – Vol. 110. - P. 1762-1769.

151 Hochhauser D., Meyer T., Spanswick V.J. et al. Phase I study of sequence-selective minor groove DNA binding agent SJG-136 in patients with advanced solid tumors // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* – 2009. – Vol. 15. - P. 2140-2147.

- 152 Fong P.C., Boss D.S., Yap T.A. et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers // *The New England journal of medicine*. – 2009. – Vol. 361. - P. 123-134.
- 153 Fandy T.E. Development of DNA methyltransferase inhibitors for the treatment of neoplastic diseases // *Current medicinal chemistry*. – 2009. – Vol. 16. - P. 2075-2085.
- 154 Karp J.E., Ricklis R.M., Balakrishnan K. et al. A phase 1 clinical-laboratory study of clofarabine followed by cyclophosphamide for adults with refractory acute leukemias // *Blood*. – 2007. – Vol. 110. - P. 1762-1769.
- 155 Gaymes T.J., Padua R.A., Pla M. et al. Histone deacetylase inhibitors (HDI) cause DNA damage in leukemia cells: a mechanism for leukemia-specific HDI-dependent apoptosis? // *Mol Cancer Res*. – 2006. – Vol. 4. - P. 563-573.
- 156 Redon C.E., Weyemi U., Parekh P.R. et al. γ -H2AX and other histone post-translational modifications in the clinic // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – Vol. 1819, №7. - P. 743-756.
- 157 LoRusso P.M., Li J., Burger A. et al. Phase I Safety, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Study of the Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitor Veliparib (ABT-888) in Combination with Irinotecan in Patients with Advanced Solid Tumors // *Clin Cancer Res*. – 2016. – Vol. 1, №22(13). - P. 3227-3237.
- 158 Viswanathan S., Wesolowski R., Rachel M., Layman. et al. A phase I dose-escalation study of ABT-888 (veliparib) in combination with carboplatin in HER2-negative metastatic breast cancer (MBC) // *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2011. – Vol. 29. - P. 106.
- 159 Kummar S., Chen A., Ji J., Zhang Y. Phase I study of PARP inhibitor ABT-888 in combination with topotecan in adults with refractory solid tumors and lymphomas // *Cancer Res*. – 2011. – Vol. 71. - P. 5626–5634.
- 160 Fong P.C., Boss D.S., Yap T.A. et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers // *The New England journal of medicine*. – 2009. – Vol. 361. - P. 123–134.
- 161 Karp J.E., Ricklis R.M., Balakrishnan K., et al. A phase 1 clinical-laboratory study of clofarabine followed by cyclophosphamide for adults with refractory acute leukemias // *Blood*. – 2007. – Vol. 110. - P. 1762–1769.
- 162 Fandy T.E., Herman J.G., Kerns P. et al. Early epigenetic changes and DNA damage do not predict clinical response in an overlapping schedule of 5-azacytidine and entinostat in patients with myeloid malignancies // *Blood*. – 2009. – Vol. 24, №114(13). - P. 2764-2773.
- 163 Dickey J.S., Redon C.E., Nakamura A.J. et al. H2AX: Functional roles and potential applications // *Chromosoma*. – 2009. – Vol. 118. - P. 683–692.
- 164 Redon C.E., Nakamura A.J., Martin O.A. et al. Recent developments in the use of gamma-H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker // *Aging (Albany NY)*. – 2011. – Vol. 3. - P. 168–174.
- 165 Ivashkevich A., Redon C.E., Nakamura A.J. et al. Use of the gamma-H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research // *Cancer Lett*. – 2012. – Vol. 327. - P. 123–133.

166 Redon C.E., Weyemi U., Parekh P.R. et al. γ -H2AX and other histone post-translational modifications in the clinic // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – Vol. 1819, №7. - P. 743-756.

167 Сравнительная экспериментально-клиническая оценка и методы коррекции осложнений, вызванных химиотерапией неопластических процессов молочных желез ассоциированных с мутациями генов BRCA1, BRCA2 (экспериментально-клиническое исследование: отчет о НИР. – 2019 https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Fwww.ncste.kz%2Fassets%2Freport_files%2F2019%2FAP05136061-OT-19%2Fru_54027__275649_1572428987.docx&wdOrigin=BROWSELINK 11.09.22.

168 Смагулова Г.А., Айтмагамбетова М.А., Векленко Г.В., и др. Количественная оценка двухцепочечных разрывов ДНК при доброкачественных и злокачественных заболеваниях молочной железы // *Онкология и Радиология Казахстана*. – 2023. – Т. 2, №68. - С. 28-35.

169 Айтмагамбетова М.А., Смагулова Г.А., Изтлеуов Е.М., и др. Клинико-эпидемиологический анализ рака молочной железы в Актыубинской области // *Астана медициналық журналы*. – 2019. – Т. 3, №101. - С. 126-130.

170 Aitmagambetova M.A., Smagulova G.A., Tuhvatshin R.R., et al. Genetic and clinical characteristics of BRCA-associated hereditary breast cancer in the West region of Kazakhstan // *Carcinogenesis*. – 2022. – Vol. 43(9). - P. 838-841.

171 Aitmagambetova M., Smagulova G., Bekmukhambetov Y., et al. A clinical case of diagnosis of breast cancer in patients with family history of BRCA mutations 1 // *Rep Pract Oncol Radiother*. – 2021. – Vol. 9, №26(3). - P. 463-469.

172 Kumar R., Indrayan A. Receiver operating characteristic (ROC) curve for medical researchers // *Indian Pediatr*. – 2011. – Vol. 48, №4. – P. 277-287.

173 Aitmagambetova M., Smagulova G., Sakhanova S., et al. The γ -H2AX foci as an indicator for double-stranded DNA breaks and response to ongoing chemotherapy in breast cancer women: a pilot study // *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. – 2023. – Vol. 27, №13. - P. 6282-6292

174 Youlden D.R., Cramb S.M., Yip C.H. et al. Incidence and mortality of female breast cancer in the Asia-Pacific region // *Cancer Biol Med*. – 2014. – Vol. 11, №2. - P. 101–115.

175 DeSantis C.E., Bray F., Ferlay J. et al. International variation in female breast cancer incidence and mortality rates // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. – 2015. – Vol. 24. - P. 1495-506.

176 Jemal A., Bray F., Center M.M. et al. Global cancer statistics // *CA Cancer J Clin*. – 2011. – Vol. 61. - P. 69-90.

177 Long N., Moore M.A., Chen W. et al. Cancer epidemiology and control in north-East Asia - past, present and future // *Asian Pac J Cancer Prev*. – 2010. – Vol. 11. - P. 107-148.

178 Moore M.A., Attasara P., Khuhaprema T. et al. Cancer epidemiology in mainland South-East Asia - past, present and future // *Asian Pac J Cancer Prev*. - 2010. – Vol. 11. - P. 67-80.

- 179 Moore M.A., Eser S., Iginov N. et al. Cancer epidemiology and control in north-western and central Asia past, present and future // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2010. – Vol. 11. - P. 17-32.
- 180 Salim E.I., Moore M.A., Bener A. et al. Cancer epidemiology in South-West Asia - past, present and future // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2010. – Vol. 11. - P. 33-48.
- 181 Forouzanfar M.H., Foreman K.J., Delossantos A.M. et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis // *Lancet.* – 2011. – Vol. 378. - P. 1461-1484.
- 182 Bhoo-Pathy N., Yip C.H., Hartman M. et al. Breast cancer research in Asia: adopt or adapt Western knowledge? // *Eur J Cancer.* – 2013. – Vol. 49. - P. 703-709.
- 183 Chukmaitov A.S., Kaidarova D.R., Talaeyva S.T. et al. Analysis of Delays in Breast Cancer Treatment and Late-Stage Diagnosis in Kazakhstan // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2018. – Vol. 19, №9. - P. 2519–2525.
- 184 Abiltayeva A., Moore M.A., Myssayev A. et al. Clinical, histopathological and molecular characteristics of metastatic breast cancer in North-Eastern Kazakhstan: a 10 year retrospective study // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2016. – Vol. 17. - P. 4797–4802.
- 185 Rakhimova M.N., Urazayeva S.T., Urazayev O.N. et al. Breast cancer epidemiology (literature review) // *West Kazakhstan Medical journal.* – 2019. – Vol. 61, №1. - P. 46–55.
- 186 Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics // *CA Cancer J Clin.* – 2019. – Vol. 69, №1. - P. 7-34.
- 187 Cancer survival in England: national estimates for patients followed up to 2017 // Office for National Statistics. - 2019 <https://www.ons.gov.uk/peoplepopulationandcommunity/healthandsocialcare/conditionsanddiseases/bulletins/cancersurvivalinengland/nationalestimatesforpatientsfollowedupto2017> 16.11.2019.
- 188 WHO. Breast cancer: prevention and control <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>. 15.11.2019.
- 189 Hamdi Cherif M. et al. Cancer estimation of incidence and survival in Algeria 2014 // *J Cancer Res Ther.* – 2015. – Vol. 3, №9. - P. 100–104.
- 190 Хайдарова Т.С., Жилкайдарова А.Ж., Курмангалиева Г.А. и др. Анализ Индикаторов качества скрининга рака молочной железы // *Известия Национальной Академии Наук Республики Казахстан.* – 2018. – Vol. 2, №326. - С. 55-60.
- 191 Bray F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA Cancer J. Clin.* – 2018. – Vol. 68. - P. 394–424.
- 192 Reiner A.S. et al. Breast cancer family history and contralateral breast cancer risk in young women: An update from the Women's Environmental Cancer and Radiation Epidemiology Study // *J. Clin. Oncol.* – 2018. – Vol. 36. - P. 1513–1520.
- 193 Ferla R. et al. Founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes // *Ann Oncol.* – 2007. – Vol. 18, suppl 6. - P. 93–98.

- 194 Gorski B. et al. A high proportion of founder BRCA1 mutations in Polish breast cancer families // *Int J Cancer*. – 2004. – Vol. 110. - P. 683–686.
- 195 Sokolenko A.P. et al. High frequency of BRCA1 5382insC mutation in Russian breast cancer patients // *Eur J Cancer*. – 2006. – Vol. 42. - P. 1380–1384.
- 196 Ramus S.J., Kote-Jarai Z., Friedman L.S. et al. Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Hungarian families with breast or breast-ovarian cancer // *Am J Hum Genet*. – 1997. – Vol. 60. - P. 1242–1246.
- 197 Krajc M., Teugels E., Zgajnar J. et al. Five recurrent BRCA1/2 mutations are responsible for cancer predisposition in the majority of Slovenian breast cancer families // *BMC Med Genet*. – 2008. – Vol. 9. - P. 83.
- 198 Couch F.J., Weber B.L. Mutations and polymorphisms in the familial early-onset breast cancer (BRCA1) gene // *Breast Cancer Information Core. Hum Mutat*. – 1996. – Vol. 8. - P. 8–18.
- 199 Ladopoulou A. et al. Germ line BRCA1 & BRCA2 mutations in Greek breast/ovarian cancer families: 5382insC is the most frequent mutation observed // *Cancer Lett*. – 2002. – Vol. 185. - P. 61–70.
- 200 Backe J. et al. Frequency of BRCA1 mutation 5382insC in German breast cancer patients // *Gynecol Oncol*. – 1999. – Vol. 72. - P. 402–406.
- 201 Caligo M.A., et al. BRCA1 germline mutational spectrum in Italian families from Tuscany: a high frequency of novel mutations // *Oncogene*. – 1996. – Vol. 13. - P. 1483–1488.
- 202 Батенева Е.И. Новая диагностическая панель для выявления наследственной предрасположенности к развитию рака молочной железы и рака яичников: дис. ... канд. мед. наук. - М., 2015. - 125 с.
- 203 Miarons M. et al. Allelic Frequency of DPYD Genetic Variants in Patients With Cancer in Spain: The PhotoDPYD Study // *The Oncologist*. – 2023. – Vol. 28. - P. 304–308.
- 204 Lam S.W., Guchelaar H.J., Boven E. The role of pharmacogenetics in capecitabine efficacy and toxicity // *Cancer Treat Rev*. – 2016. – Vol. 50. - P. 9-22.
- 205 Bray J., Sludden J., Griffin M. et al. Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide // *Br J Cancer*. – 2010. – Vol. 102. - P. 1003–1009.
- 206 Rosenberg S., Devir M., Kaduri L. et al. Distinct breast cancer phenotypes in BRCA 1/2 carriers based on ER status // *Breast Cancer Res Treat*. – 2023. – Vol. 198. - P. 197–205.
- 207 Tarek Magdy., Zhengxin Jiang., Mariam Jouni. RARG variant predictive of doxorubicin-induced cardiotoxicity identifies a cardioprotective therapy // *Cell Stem Cell*. – 2021. – Vol. 28. - P. 2076-2089.
- 208 Bayley J.P. Succinate dehydrogenase gene variants and their role in Cowden syndrome // *American Journal of Human Genetics*. – 2011. – Vol. 88, №5. - P. 674-675.
- 209 Cox D.G., Simard J., Sinnett D. et al. Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2. Common variants of the BRCA1 wild-type allele modify the

risk of breast cancer in BRCA1 mutation carriers // *Hum Mol Genet.* – 2011. – Vol. 1, №20(23). - P. 4732-4747.

210 Arlindo F., Irina A., Inês V. et al. The prognostic role of RANK SNP rs34945627 in breast cancer patients with bone metastases // *Oncotarget.* – 2016. - Vol. 7. – P. 16-29.

211 Amikar Sehdev., Olumide Gbolahan., Brad A. Hancock. et al. Germline and Somatic DNA Damage Repair Gene Mutations and Overall Survival in Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma Patients Treated with FOLFIRINOX // *Clin Cancer Res.* – 2018. – Vol. 24, №24. - P. 6204–6211.

212 Pensabene M., Von Arx C., De Laurentiis M. Male Breast Cancer: From Molecular Genetics to Clinical Management // *Cancers (Basel).* – 2022. – Vol. 15, №14(8). - P. 2006.

213 Thompson Ella., Gorringer Kylie., Rowley Simone et al. Reevaluation of the BRCA2 truncating allele c.9976A > T (p.Lys3326Ter) in a familial breast cancer context // *Scientific reports.* – 2015. – Vol. 5. – P. 18-26.

214 Sangita Dattatray Shinde., Dinesh Parshuram Satpute., Santosh Kumar Behera. et al. Computational Biology of BRCA2 in Male Breast Cancer, through Prediction of Probable nsSNPs, and Hit Identification // *ACS Omega.* – 2022. – Vol. 7, №34. - P. 30447-30461.

215 Kamali M., Hamadani S., Neamatzadeh H. et al. Association of XRCC2 rs3218536 Polymorphism with Susceptibility of Breast and Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2017. – Vol. 27, №18(7). - P. 1743-1749.

216 Fernández-Lopez J.C., Romero-Córdoba S., Rebollar-Vega R. Population and breast cancer patients' analysis reveals the diversity of genomic variation of the BRCA genes in the Mexican population // *Hum Genomics.* – 2019. – Vol. 10, №13(1). - P. 3.

217 Chitralla K.N., Yeguvapalli S. Computational screening and molecular dynamic simulation of breast cancer associated deleterious non-synonymous single nucleotide polymorphisms in TP53 gene // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 8, №9(8). - P. 104242.

218 Rawya Ibrahim Rabeh AlRaddadi., Razan Jamaan Nafaa Alamri., Weam Talal Yehya Shebli. et al. Fibroblast growth factor receptor 2 gene (FGFR2) rs2981582T/C polymorphism and susceptibility to breast cancer in Saudi women // *Saudi Journal of Biological Sciences.* – 2021. – Vol. 28. - P. 6112-6115.

219 Qian D., Liu H., Zhao L. et al. A pleiotropic ATM variant (rs1800057 C>G) is associated with risk of multiple cancers // *Carcinogenesis.* – 2022. – Vol. 11, №43(1). - P. 60-66.

220 Johnson N., Fletcher O., Palles C. et al. Counting potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility // *Hum Mol Genet.* – 2007. – Vol. 1, №16(9). - P. 1051-1057.

221 Zhang B., Beeghly-Fadiel A., Long J., Zheng W. Genetic variants associated with breast-cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence // *Lancet Oncol.* – 2011. – Vol. 12, №5. – P. 477-488.

222 Khan Y., Khan N.U., Ali I. et al. Significant association of BRCA1 (rs1799950), BRCA2 (rs144848) and TP53 (rs1042522) polymorphism with breast cancer risk in Pashtun population of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan // *Mol Biol Rep.* – 2023. – Vol. 10. – P. 16-41.

223 Nichola Johnson. et al. Counting potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility // *Human Molecular Genetics.* – 2007. – Vol. 16, №9. - P. 1051–1057.

224 Abbasi Samina Asghar., Baig Ruqia Mehmood., Ahmed Mehvish Naseer., et al. MAP3K1 SNP rs889312 potential risk and MAP3K9 SNP rs11628333 menopause dependent association for breast cancer // *Turkish Journal of Biochemistry.* – 2022. – Vol. 47. - P. 417-423.

225 Kooshyar Mohammad Mahdi., Nassiri, Mohammadreza., Nasiri, Khadijeh. Hereditary Genes and SNPs Associated with Breast Cancer // *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP.* – 2013. – Vol. 14. - P. 3403-3409.

226 Wang B., Wang Y., Zhao L. MMP-9 gene rs3918242 polymorphism increases risk of stroke: A meta-analysis // *J Cell Biochem.* – 2018. – Vol. 119, №12. - P. 9801-9808.

227 Rajagopal T., Seshachalam A., Jothi A. et al. Analysis of pathogenic variants in BRCA1 and BRCA2 genes using next-generation sequencing in women with triple negative breast cancer from South India // *Mol Biol Rep.* – 2022. – Vol. 49, №4. - P. 3025-3032.

228 Liu S.Y., Zhang C.J., Si X.M. Association between single nucleotide polymorphisms of 5'-untranslated region of GPx4 gene and male infertility // *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* – 2011. – Vol. 28, №3. - P. 270-274.

229 Siddiqui Sarah., Chattopadhyay Shilpi., Akhtar Mohammad. A Study on Genetic Variants of Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2) and the Risk of Breast Cancer from North India // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9. – P. 18-29.

230 Мулерова Т.А., Огарков М.Ю. Межэтнические ассоциации повышенной частоты сердечных сокращений, как фактора сердечно-сосудистого риска. Генетические маркеры // *Евразийский Кардиологический Журнал.* – 2021. – №1, ч. 2. - С. 88-93.

231 Shu J., Hui X., Zheng X. et al. Correlation of FGFR2 rs2981582 polymorphisms with susceptibility to breast cancer: a case-control study in a Chinese population // *J Int Med Res.* – 2019. – Vol. 47, №10. - P. 4753-4763.

232 Boyarskikh U.A., Zarubina N.A., Biltueva J.A. et al. Association of FGFR2 gene polymorphisms with the risk of breast cancer in population of West Siberia // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2009. – Vol. 17. – P. 1688–1691.

233 Aminkeng F., Bhavsar A.P., Visscher H. et al. A coding variant in RARG confers susceptibility to anthracycline-induced cardiotoxicity in childhood cancer // *Nat. Genet.* – 2015. – Vol. 47. – P. 1079–1084.

234 Zolk O., von dem Knesebeck A., Graf N. Cardiovascular Health Status And Genetic Risk In Survivors of Childhood Neuroblastoma and Nephroblastoma Treated With Doxorubicin: Protocol of the Pharmacogenetic Part of the LESS-Anthra Cross-Sectional Cohort Study // *JMIR Res Protoc.* – 2022. – Vol. 11, №2. - P. 27898.

- 235 Harlid S., Ivarsson M.I.L., Butt S. et al. Combined effect of low-penetrant SNPs on breast cancer risk // *Br J Cancer*. – 2012. – Vol. 106. - P. 389–396.
- 236 Zheng Q., Ye J., Wu H. et al. Association between mitogen-activated protein kinase Kinase Kinase 1 polymorphisms and breast cancer susceptibility: a meta-analysis of 20 case-control studies // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. - P. 1–9.
- 237 Jara L., Gonzalez-Hormazabal P., Cerceño K. et al. Genetic variants in FGFR2 and MAP3K1 are associated with the risk of familial and early-onset breast cancer in a south American population // *Breast Cancer Res Treat*. – 2013. – Vol. 137. - P. 559–569.
- 238 De Bruin M.A., Kwong A., Goldstein B.A. et al. Breast cancer risk factors differ between Asian and white women with BRCA1/2 mutations // *Fam Cancer*. – 2012. – Vol. 11. - P. 429–439.
- 239 Zheng Q., Ye J., Wu H. et al. Association between mitogen-activated protein kinase Kinase Kinase 1 polymorphisms and breast cancer susceptibility: a meta-analysis of 20 case-control studies // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. - P. 1–9.
- 240 Oberdoerffer P., Miller K.M. Histone H2A variants: Diversifying chromatin to ensure genome integrity // *Semin Cell Dev Biol*. – 2023. – Vol. 15, №135. - P. 59-72.
- 241 Reddig A., Lorenz S., Hiemann R. et al. Assessment of modulated cytostatic drug resistance by automated γ H2AX analysis // *Cytometry*. – 2015. – Vol. 87. - P. 724-732.
- 242 Wang B., Zhang Z., Xia S. et al. Expression of γ -H2AX and patient prognosis in breast cancer cohort // *J Cell Biochem*. – 2019. – Vol. 120. - P. 12958- 12965.
- 243 Brunner A.H., Hinterholzer S., Riss P. et al. Expression of γ -H2AX in endometrial carcinomas: an immunohistochemical study with p53 // *Gynecol Oncol*. – 2011. – Vol. 121. - P. 206-211.
- 244 Tuma R.S. Sometimes size doesn't matter: reevaluating RECIST and tumor response rate endpoints // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2006. – Vol. 98. - P. 1272–1274.
- 245 Trenner A., Sartori AA. Harnessing DNA Double-Strand Break Repair for Cancer Treatment // *Front Oncol*. – 2019. – Vol. 10, №9. - P. 1388.
- 246 Fraser C.G. Biological variation: a rapidly evolving aspect of laboratory medicine // *J Lab Precis Med*. – 2017. – Vol. 2. - P. 35.
- 247 Wiwanitkit V. Errors in medical laboratory but still forgotten // *J Lab Precis Med*. – 2017. – Vol. 2. - P. 65.
- 248 Zhang Z. The role of big-data in clinical studies in laboratory medicine // *J Lab Precis Med*. – 2017. – Vol. 2. - P. 34.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Локализация полиморфизма в хромосоме и референсное значение аллелей 113 кандидатных генов

Таблица А 1

dbSNP	Chrom	Position	REF Allele
rs616488	chr1	10566215	A
rs33927012	chr1	17354297	A
rs11203289	chr1	17380507	G
rs67376798	chr1	97547947	T
rs3918290	chr1	97915614	C
rs55886062	chr1	97981343	A
rs11249433	chr1	121280613	A
rs6678914	chr1	202187176	G
rs438034	chr1	214830617	A
rs10824792	chr10	54526206	C
rs12248560	chr10	96521657	C
rs4244285	chr10	96541616	G
rs12762549	chr10	101620771	C
rs7895676	chr10	123333997	C
rs2981578	chr10	123340311	C
rs1219648	chr10	123346190	A
rs2981582	chr10	123352317	A
rs3135718	chr10	123353869	C
rs3817198	chr11	1909006	T
rs3218707	chr11	108114727	G
rs2227924	chr11	108122592	C
rs4986761	chr11	108124761	T
rs3218695	chr11	108129778	C
rs1800056	chr11	108138003	T
rs1800057	chr11	108143456	C
rs3092856	chr11	108159732	C
rs1800058	chr11	108160350	C
rs11045585	chr12	21045694	A
rs2229774	chr12	53605545	G
rs766173	chr13	32906480	A
rs144848	chr13	32906729	A
rs4987117	chr13	32914236	C
rs1799954	chr13	32914592	C
rs11571746	chr13	32945108	T
rs11571747	chr13	32945172	A
rs4987047	chr13	32953529	A
rs11571833	chr13	32972626	A
rs1801426	chr13	32972884	A
rs3784099	chr14	68749927	G
rs4778137	chr15	28327835	C
rs121917739	chr15	41011016	G

Таблица А 2

dbSNP	Chrom	Position	REF Allele
rs4646	chr15	51502844	A
rs2290203	chr15	91512067	G
rs3803662	chr16	52586341	A
rs12922061	chr16	52635000	C
rs1800566	chr16	69745145	G
rs9934948	chr16	73439355	C
rs1042522	chr17	7579472	G
rs1799966	chr17	41223094	T
rs16942	chr17	41244000	T
rs2227945	chr17	41244130	T
rs4986850	chr17	41245471	C
rs1799950	chr17	41246481	T
rs6504950	chr17	53056471	G
rs34945627	chr18	60036498	C
rs757229	chr19	1102114	G
rs713041	chr19	1106615	T
rs12721655	chr19	41510282	A
rs1800470	chr19	41858921	G
rs1045485	chr2	202148589	G
rs13387042	chr2	217905832	A
rs17863783	chr2	234602277	G
rs3918242	chr20	44635976	C
rs8133052	chr21	37507501	G
rs17879961	chr22	29121087	A
rs6001930	chr22	40876234	T
rs3892097	chr22	42524947	C
rs1065852	chr22	42526694	G
rs4973768	chr3	27416013	C
rs4415084	chr5	44662515	C
rs889312	chr5	56031884	C
rs351855	chr5	176520243	G
rs1143684	chr6	3010390	C
rs17530068	chr6	82193109	T
rs12210538	chr6	110760008	A
rs714368	chr6	110778128	T
rs2046210	chr6	151948366	G
rs3798577	chr6	152421130	T
rs1045642	chr7	87138645	A
rs2032582	chr7	87160618	A
rs2032582	chr7	87160618	A
rs2740574	chr7	99382096	C
rs1799983	chr7	150696111	T
rs3218536	chr7	152346007	C
rs1054135	chr8	82390760	C
rs16902094	chr8	128320346	A
rs620861	chr8	128335673	G
rs13281615	chr8	128355618	A
rs7853758	chr9	86900926	G

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Первичные показатели результатов генотипирования

Таблица Б 1

SNP	GROUP	Ntotal	Typed p	Minor	MAF	A1	A2	A1 ct	A2 ct	A1 p	A2 p	Hom1	Het	Hom2	Hom1 ct	Het ct	Hom2 ct	Hom1 p	Het p	Hom2 p	HWE p
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
rs616488	RMJ	149	1	G	0.265	A	G	219	79	0.735	0.265	A/A	A/G	G/G	82	55	12	0.55	0.369	0.081	0.633914
rs616488	Control	150	1	G	0.27	A	G	219	81	0.73	0.27	A/A	A/G	G/G	80	59	11	0.533	0.393	0.073	0.882122
rs33927012	RMJ	149	1	G	0.007	A	G	296	2	0.993	0.007	A/A	A/G		147	2		0.987	0.013		0
rs33927012	Control	150	1	A	1	A		300		1		A/A			150			1			1
rs11203289	RMJ	149	1	C	0.134	G	C	258	40	0.866	0.134	G/G	G/C		109	40		0.732	0.268		0.113484
rs11203289	Control	150	1	C	0.207	G	C	238	62	0.793	0.207	G/G	G/C		88	62		0.587	0.413		0.002855
rs67376798	RMJ	149	0.993	A	0.007	T	A	294	2	0.993	0.007	T/T	A/T		146	2		0.986	0.014		0
rs67376798	Control	150	1	A	0.003	T	A	299	1	0.997	0.003	T/T	A/T		149	1		0.993	0.007		0
rs3918290	RMJ	149	1	T	0.134	C	T	258	40	0.866	0.134	C/C	C/T		109	40		0.732	0.268		0.113484
rs3918290	Control	150	1	T	0.207	C	T	238	62	0.793	0.207	C/C	C/T		88	62		0.587	0.413		0.002855
rs55886062	RMJ	149	0.993	C	0.135	A	C	256	40	0.865	0.135	A/A	A/C		108	40		0.73	0.27		0.111375
rs55886062	Control	150	1	C	0.207	A	C	238	62	0.793	0.207	A/A	A/C		88	62		0.587	0.413		0.002855
rs11249433	RMJ	149	1	G	0.208	A	G	236	62	0.792	0.208	A/A	A/G	G/G	93	50	6	0.624	0.336	0.04	0.951709
rs11249433	Control	150	1	G	0.173	A	G	248	52	0.827	0.173	A/A	A/G	G/G	103	42	5	0.687	0.28	0.033	0.940774
rs6678914	RMJ	149	1	A	0.238	A	G	71	227	0.238	0.762	G/G	A/G	A/A	85	57	7	0.57	0.383	0.047	0.633704
rs6678914	Control	150	0.993	A	0.218	A	G	65	233	0.218	0.782	G/G	A/G	A/A	89	55	5	0.597	0.369	0.034	0.420106
rs438034	RMJ	149	0.987	A	0.259	G	A	218	76	0.741	0.259	G/G	A/G	A/A	80	58	9	0.544	0.395	0.061	0.851101
rs438034	Control	150	1	A	0.237	A	G	71	229	0.237	0.763	G/G	A/G	A/A	90	49	11	0.6	0.327	0.073	0.321841
rs10824792	RMJ	149	1	C	0.362	C	T	108	190	0.362	0.638	T/T	C/T	C/C	61	68	20	0.409	0.456	0.134	0.962521
rs10824792	Control	150	1	C	0.31	T	C	207	93	0.69	0.31	T/T	C/T	C/C	70	67	13	0.467	0.447	0.087	0.694361
rs199476086	RMJ	149	0.987	A	0.099	A	C	29	265	0.099	0.901	C/C	A/C		118	29		0.803	0.197		0.363583
rs199476086	Control	150	0.973	A	0.199	C	A	234	58	0.801	0.199	C/C	A/C		88	58		0.603	0.397		0.005486
rs12248560	RMJ	149	0.933	T	0.079	C	T	256	22	0.921	0.079	C/C	C/T		117	22		0.842	0.158		0.62793

Продолжение таблицы Б 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
rs12248560	Control	150	0.967	T	0.079	C	T	267	23	0.921	0.079	C/C	C/T		122	23		0.841	0.159		0.603096
rs4244285	RMJ	149	0.993	A	0.182	A	G	54	242	0.182	0.818	G/G	A/G	A/A	99	44	5	0.669	0.297	0.034	0.83874
rs4244285	Control	150	1	A	0.173	A	G	52	248	0.173	0.827	G/G	A/G	A/A	102	44	4	0.68	0.293	0.027	0.937541
rs12762549	RMJ	149	1	C	0.44	G	C	167	131	0.56	0.44	G/G	C/G	C/C	43	81	25	0.289	0.544	0.168	0.255537
rs12762549	Control	150	1	G	0.487	G	C	146	154	0.487	0.513	C/C	C/G	G/G	40	74	36	0.267	0.493	0.24	0.958559
rs7895676	RMJ	149	0.96	C	0.182	T	C	234	52	0.818	0.182	T/T	T/C		91	52		0.636	0.364		0.015564
rs7895676	Control	150	0.98	C	0.245	T	C	222	72	0.755	0.245	T/T	T/C		75	72		0.51	0.49		0.000176
rs2981578	RMJ	149	0.96	T	0.455	C	T	156	130	0.545	0.455	C/C	C/T	T/T	49	58	36	0.343	0.406	0.252	0.040304
rs2981578	Control	150	0.96	T	0.427	T	C	123	165	0.427	0.573	C/C	C/T	T/T	57	51	36	0.396	0.354	0.25	0.001438
rs1219648	RMJ	149	0.993	G	0.422	A	G	171	125	0.578	0.422	A/A	A/G	G/G	52	67	29	0.351	0.453	0.196	0.452047
rs1219648	Control	150	1	G	0.347	A	G	196	104	0.653	0.347	A/A	A/G	G/G	63	70	17	0.42	0.467	0.113	0.8142
rs2981582	RMJ	149	0.946	G	0.44	A	G	158	124	0.56	0.44	A/A	A/G	G/G	27	104	10	0.191	0.738	0.071	0
rs2981582	Control	150	0.92	A	0.254	G	A	206	70	0.746	0.254	G/G	A/G	A/A	81	44	13	0.587	0.319	0.094	0.094374
rs3135718	RMJ	149	1	C	0.406	T	C	177	121	0.594	0.406	T/T	T/C	C/C	54	69	26	0.362	0.463	0.174	0.718155
rs3135718	Control	150	1	C	0.343	T	C	197	103	0.657	0.343	T/T	T/C	C/C	64	69	17	0.427	0.46	0.113	0.907856
rs3817198	RMJ	149	1	C	0.245	T	C	225	73	0.755	0.245	T/T	C/T	C/C	89	47	13	0.597	0.315	0.087	0.10564
rs3817198	Control	150	1	C	0.213	T	C	236	64	0.787	0.213	T/T	C/T	C/C	96	44	10	0.64	0.293	0.067	0.17937
rs3218707	RMJ	149	1	G	1	G		298		1		G/G			149			1			1
rs3218707	Control	150	1	G	1	G		300		1		G/G			150			1			1
rs2227924	RMJ	149	0.993	G	0.135	C	G	256	40	0.865	0.135	C/C	C/G		108	40		0.73	0.27		0.111375
rs2227924	Control	150	1	G	0.207	C	G	238	62	0.793	0.207	C/C	C/G		88	62		0.587	0.413		0.002855
rs4986761	RMJ	149	1	T	1	T		298		1		T/T			149			1			1
rs4986761	Control	150	0.993	T	1	T		298		1		T/T			149			1			1
rs3218695	RMJ	149	0.993	C	1	C		296		1		C/C			148			1			1
rs3218695	Control	150	1	C	1	C		300		1		C/C			150			1			1
rs1800056	RMJ	149	1	T	1	T		298		1		T/T			149			1			1
rs1800056	Control	150	1	C	0.003	T	C	299	1	0.997	0.003	T/T	C/T		149	1		0.993	0.007		0
rs1800057	RMJ	149	0.993	G	0.135	C	G	256	40	0.865	0.135	C/C	C/G		108	40		0.73	0.27		0.111375

Продолжение таблицы Б 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
rs1800057	Control	150	1	G	0.207	C	G	238	62	0.793	0.207	C/C	C/G		88	62		0.587	0.413		0.002855
rs3092856	RMJ	149	0.987	T	0.136	C	T	254	40	0.864	0.136	C/C	C/T		107	40		0.728	0.272		0.109272
rs3092856	Control	150	0.993	T	0.208	C	T	236	62	0.792	0.208	C/C	C/T		87	62		0.584	0.416		0.002702
rs1800058	RMJ	149	0.96	T	0.164	C	T	239	47	0.836	0.164	C/C	C/T	T/T	97	45	1	0.678	0.315	0.007	0.138447
rs1800058	Control	150	0.887	T	0.274	C	T	193	73	0.726	0.274	C/C	C/T	T/T	63	67	3	0.474	0.504	0.023	0.003955
rs121908984	RMJ	149	1	C	1	C		298		1		C/C			149			1			1
rs121908984	Control	150	1	C	1	C		300		1		C/C			150			1			1
rs11045585	RMJ	149	1	G	0.201	G	A	60	238	0.201	0.799	A/A	A/G	G/G	93	52	4	0.624	0.349	0.027	0.407779
rs11045585	Control	150	1	G	0.16	A	G	252	48	0.84	0.16	A/A	A/G	G/G	105	42	3	0.7	0.28	0.02	0.797658
rs2229774	RMJ	149	0.987	A	0.364	G	A	187	107	0.636	0.364	G/G	A/G		40	107		0.272	0.728		0
rs2229774	Control	150	1	A	0.067	G	A	280	20	0.933	0.067	G/G	A/G	A/A	131	18	1	0.873	0.12	0.007	0.835035
rs766173	RMJ	149	0.993	C	0.108	A	C	264	32	0.892	0.108	A/A	A/C	C/C	117	30	1	0.791	0.203	0.007	0.801487
rs766173	Control	150	0.993	C	0.121	A	C	262	36	0.879	0.121	A/A	A/C	C/C	116	30	3	0.779	0.201	0.02	0.762276
rs144848	RMJ	149	1	C	0.228	A	C	230	68	0.772	0.228	A/A	A/C	C/C	93	44	12	0.624	0.295	0.081	0.074704
rs144848	Control	150	1	C	0.23	A	C	231	69	0.77	0.23	A/A	A/C	C/C	86	59	5	0.573	0.393	0.033	0.244118
rs4987117	RMJ	149	1	T	0.134	C	T	258	40	0.866	0.134	C/C	C/T		109	40		0.732	0.268		0.113484
rs4987117	Control	150	1	T	0.213	C	T	236	64	0.787	0.213	C/C	C/T		86	64		0.573	0.427		0.001812
rs80359550	RMJ	149	0.993	T	0.119	*	T	296	40	0.881	0.119	*/*	*/T		108	40		0.73	0.27		0.111375
rs80359550	Control	150	0.993	T	0.172	*	T	298	62	0.828	0.172	*/*	*/T		87	62		0.584	0.416		0.002702
rs1799954	RMJ	149	1	T	0.134	C	T	258	40	0.866	0.134	C/C	C/T		109	40		0.732	0.268		0.113484
rs1799954	Control	150	1	T	0.21	C	T	237	63	0.79	0.21	C/C	C/T		87	63		0.58	0.42		0.002281
rs80359062	RMJ	149	1	G	0.134	C	G	258	40	0.866	0.134	C/C	C/G		109	40		0.732	0.268		0.113484
rs80359062	Control	150	1	G	0.207	C	G	238	62	0.793	0.207	C/C	C/G		88	62		0.587	0.413		0.002855
rs11571746	RMJ	149	0.993	C	0.007	T	C	294	2	0.993	0.007	T/T	C/T		146	2		0.986	0.014		0
rs11571746	Control	150	0.993	T	1	T		298		1		T/T			149			1			1
rs11571747	RMJ	149	1	C	0.134	A	C	258	40	0.866	0.134	A/A	A/C		109	40		0.732	0.268		0.113484
rs11571747	Control	150	1	C	0.207	A	C	238	62	0.793	0.207	A/A	A/C		88	62		0.587	0.413		0.002855
rs4987047	RMJ	149	1	A	1	A		298		1		A/A			149			1			1

Продолжение таблицы Б 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
rs4987047	Control	150	1	A	1	A		300		1		A/A			150			1			1
rs11571833	RMJ	149	0.98	T	0.14	A	T	251	41	0.86	0.14	A/A	A/T		105	41		0.719	0.281		0.094157
rs11571833	Control	150	1	T	0.207	A	T	238	62	0.793	0.207	A/A	A/T		88	62		0.587	0.413		0.002855
rs1801426	RMJ	149	1	G	0.037	A	G	287	11	0.963	0.037	A/A	A/G		138	11		0.926	0.074		0.50911
rs1801426	Control	150	0.993	G	0.047	A	G	284	14	0.953	0.047	A/A	A/G		135	14		0.906	0.094		0.762728
rs3784099	RMJ	149	0.993	A	0.23	A	G	68	228	0.23	0.77	G/G	A/G	A/A	90	48	10	0.608	0.324	0.068	0.407877
rs3784099	Control	150	0.993	A	0.218	G	A	233	65	0.782	0.218	G/G	A/G	A/A	90	53	6	0.604	0.356	0.04	0.742287
rs121434592	RMJ	149	0.987	T	0.051	C	T	279	15	0.949	0.051	C/C	T/C		132	15		0.898	0.102		0.83947
rs121434592	Control	150	0.987	T	0.037	C	T	285	11	0.963	0.037	C/C	T/C		137	11		0.926	0.074		0.512502
rs4778137	RMJ	149	1	C	0.416	G	C	174	124	0.584	0.416	G/G	C/G	C/C	50	74	25	0.336	0.497	0.168	0.882503
rs4778137	Control	150	0.987	C	0.449	C	G	133	163	0.449	0.551	G/G	C/G	C/C	40	83	25	0.27	0.561	0.169	0.13445
rs121917739	RMJ	149	0.98	A	0.003	G	A	291	1	0.997	0.003	G/G	A/G		145	1		0.993	0.007		0
rs121917739	Control	150	1	G	1	G		300		1		G/G			150			1			1
rs4646	RMJ	149	1	A	0.383	A	C	114	184	0.383	0.617	C/C	A/C	A/A	58	68	23	0.389	0.456	0.154	0.775503
rs4646	Control	150	1	A	0.36	C	A	192	108	0.64	0.36	C/C	A/C	A/A	57	78	15	0.38	0.52	0.1	0.1505
rs2290203	RMJ	149	1	A	0.493	G	A	151	147	0.507	0.493	G/G	A/G	A/A	37	77	35	0.248	0.517	0.235	0.77039
rs2290203	Control	150	1	A	0.46	A	G	138	162	0.46	0.54	G/G	A/G	A/A	45	72	33	0.3	0.48	0.22	0.769118
rs3803662	RMJ	149	0.993	A	0.486	A	G	144	152	0.486	0.514	G/G	A/G	A/A	37	78	33	0.25	0.527	0.223	0.585682
rs3803662	Control	150	0.993	G	0.497	A	G	150	148	0.503	0.497	A/A	A/G	G/G	35	80	34	0.235	0.537	0.228	0.435432
rs12922061	RMJ	149	1	T	0.248	C	T	224	74	0.752	0.248	C/C	C/T	T/T	85	54	10	0.57	0.362	0.067	0.852697
rs12922061	Control	150	1	T	0.23	C	T	231	69	0.77	0.23	C/C	C/T	T/T	87	57	6	0.58	0.38	0.04	0.481076
rs1800566	RMJ	149	0.993	A	0.355	A	G	105	191	0.355	0.645	G/G	A/G	A/A	59	73	16	0.399	0.493	0.108	0.420906
rs1800566	Control	150	1	A	0.393	A	G	118	182	0.393	0.607	G/G	A/G	A/A	51	80	19	0.34	0.533	0.127	0.190251
rs9934948	RMJ	149	0.993	T	0.372	T	C	110	186	0.372	0.628	C/C	C/T	T/T	56	74	18	0.378	0.5	0.122	0.468433
rs9934948	Control	150	0.993	T	0.406	C	T	177	121	0.594	0.406	C/C	C/T	T/T	49	79	21	0.329	0.53	0.141	0.27877
rs28934577	RMJ	149	0.993	T	0.135	A	T	256	40	0.865	0.135	A/A	A/T		108	40		0.73	0.27		0.111375
rs28934577	Control	150	1	T	0.207	A	T	238	62	0.793	0.207	A/A	A/T		88	62		0.587	0.413		0.002855
rs11540652	RMJ	149	1	C	1	C		298		1		C/C			149			1			1

Продолжение таблицы Б 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
rs11540652	Control	150	1	C	1	C		300		1		C/C			150			1			1
rs28934578	RMJ	149	0.993	T	0.135	C	T	256	40	0.865	0.135	C/C	C/T		108	40		0.73	0.27		0.111375
rs28934578	Control	150	1	T	0.207	C	T	238	62	0.793	0.207	C/C	C/T		88	62		0.587	0.413		0.002855
rs28934874	RMJ	149	1	T	0.134	G	T	258	40	0.866	0.134	G/G	G/T		109	40		0.732	0.268		0.113484
rs28934874	Control	150	1	T	0.207	G	T	238	62	0.793	0.207	G/G	G/T		88	62		0.587	0.413		0.002855
rs121912658	RMJ	149	0.993	T	1	T		296		1		T/T			148			1			1
rs121912658	Control	150	1	T	1	T		300		1		T/T			150			1			1
rs1042522	RMJ	149	1	G	0.305	C	G	207	91	0.695	0.305	C/C	C/G	G/G	68	71	10	0.456	0.477	0.067	0.176143
rs1042522	Control	150	1	G	0.337	C	G	199	101	0.663	0.337	C/C	C/G	G/G	65	69	16	0.433	0.46	0.107	0.819025
rs1799966	RMJ	149	0.98	C	0.288	C	T	84	208	0.288	0.712	T/T	C/T	C/C	69	70	7	0.473	0.479	0.048	0.058403
rs1799966	Control	150	1	C	0.333	T	C	200	100	0.667	0.333	T/T	C/T	C/C	63	74	13	0.42	0.493	0.087	0.228127
rs62625308	RMJ	149	1	A	0.134	G	A	258	40	0.866	0.134	G/G	G/A		109	40		0.732	0.268		0.113484
rs62625308	Control	150	1	A	0.207	G	A	238	62	0.793	0.207	G/G	G/A		88	62		0.587	0.413		0.002855
rs16942	RMJ	149	0.946	C	0.294	C	T	83	199	0.294	0.706	T/T	C/T	C/C	62	75	4	0.44	0.532	0.028	0.001522
rs16942	Control	150	0.92	C	0.341	T	C	182	94	0.659	0.341	T/T	C/T		44	94		0.319	0.681		0
rs2227945	RMJ	149	0.993	T	1	T		296		1		T/T			148			1			1
rs2227945	Control	150	1	T	1	T		300		1		T/T			150			1			1
rs4986850	RMJ	149	0.987	T	0.034	C	T	284	10	0.966	0.034	C/C	C/T		137	10		0.932	0.068		0.422444
rs4986850	Control	150	1	T	0.023	C	T	293	7	0.977	0.023	C/C	C/T		143	7		0.953	0.047		0.141581
rs1799950	RMJ	149	0.96	C	0.049	C	T	14	272	0.049	0.951	T/T	C/T		129	14		0.902	0.098		0.784163
rs1799950	Control	150	1	C	0.013	C	T	4	296	0.013	0.987	T/T	C/T		146	4		0.973	0.027		0.003643
rs80357382	RMJ	149	0.96	C	0.133	T	C	248	38	0.867	0.133	T/T	T/C		105	38		0.734	0.266		0.130242
rs80357382	Control	150	1	C	0.207	T	C	238	62	0.793	0.207	T/T	T/C		88	62		0.587	0.413		0.002855
rs80357064	RMJ	149	1	A	1	A		298		1		A/A			149			1			1
rs80357064	Control	150	0.993	A	1	A		298		1		A/A			149			1			1
rs6504950	RMJ	149	0.993	A	0.155	G	A	250	46	0.845	0.155	G/G	A/G	A/A	106	38	4	0.716	0.257	0.027	0.944907
rs6504950	Control	150	0.993	A	0.154	A	G	46	252	0.154	0.846	G/G	A/G	A/A	106	40	3	0.711	0.268	0.02	0.920294
rs137852985	RMJ	149	0.866	T	0.391	C	T	157	101	0.609	0.391	C/C	T/C	T/T	33	91	5	0.256	0.705	0.039	0

Продолжение таблицы Б 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
rs137852985	Control	150	0.973	T	0.045	C	T	279	13	0.955	0.045	C/C	T/C	T/T	136	7	3	0.932	0.048	0.021	0.000014
rs80357540	RMJ	149	0.993	-	0.135	AG	-	256	40	0.865	0.135	AG/AG	AG/-		108	40		0.73	0.27		0.111375
rs80357540	Control	150	1	-	0.207	AG	-	238	62	0.793	0.207	AG/AG	AG/-		88	62		0.587	0.413		0.002855
rs80357914	RMJ	149	0.973	-	0.152	CT	-	246	44	0.848	0.152	CT/CT	CT/-		101	44		0.697	0.303		0.060929
rs80357914	Control	150	1	-	0.207	CT	-	238	62	0.793	0.207	CT/CT	CT/-		88	62		0.587	0.413		0.002855
rs80357629	RMJ	149	1	T	0.126	*	T	298	43	0.874	0.126	*/*	*/T		106	43		0.711	0.289		0.076889
rs80357629	Control	150	0.98	T	0.174	*	T	294	62	0.826	0.174	*/*	*/T		85	62		0.578	0.422		0.002412
rs80357780	RMJ	149	1	-	0.134	CT	-	258	40	0.866	0.134	CT/CT	CT/-		109	40		0.732	0.268		0.113484
rs80357780	Control	150	1	-	0.207	CT	-	238	62	0.793	0.207	CT/CT	CT/-		88	62		0.587	0.413		0.002855
rs80357906	RMJ	149	1	G	0.185	-	G	243	55	0.815	0.185	-/-	-/G		94	55		0.631	0.369		0.01133
rs80357906	Control	150	1	G	0.243	-	G	227	73	0.757	0.243	-/-	-/G		77	73		0.513	0.487		0.000171
rs1787991	RMJ	149	0.745	T	0.167	G	T	185	37	0.833	0.167	G/G	G/T	T/T	75	35	1	0.676	0.315	0.009	0.257598
rs1787991	Control	150	0.927	T	0.234	G	T	213	65	0.766	0.234	G/G	G/T		74	65		0.532	0.468		0.000664
rs34945627	RMJ	149	0.98	T	0.134	C	T	253	39	0.866	0.134	C/C	C/T		107	39		0.733	0.267		0.121564
rs34945627	Control	150	0.987	T	0.206	C	T	235	61	0.794	0.206	C/C	C/T		87	61		0.588	0.412		0.003195
rs757229	RMJ	149	0.987	G	0.408	G	C	120	174	0.408	0.592	C/C	G/C	G/G	51	72	24	0.347	0.49	0.163	0.954574
rs757229	Control	150	1	C	0.47	C	G	141	159	0.47	0.53	G/G	G/C	C/C	61	37	52	0.407	0.247	0.347	0
rs713041	RMJ	149	1	T	0.376	C	T	186	112	0.624	0.376	C/C	C/T	T/T	59	68	22	0.396	0.456	0.148	0.838448
rs713041	Control	150	1	T	0.393	C	T	182	118	0.607	0.393	C/C	C/T	T/T	57	68	25	0.38	0.453	0.167	0.627498
rs12721655	RMJ	149	0.98	G	0.137	A	G	252	40	0.863	0.137	A/A	A/G		106	40		0.726	0.274		0.107176
rs12721655	Control	150	1	G	0.207	A	G	238	62	0.793	0.207	A/A	A/G		88	62		0.587	0.413		0.002855
rs1800470	RMJ	149	0.973	C	0.438	T	C	163	127	0.562	0.438	T/T	T/C	C/C	50	63	32	0.345	0.434	0.221	0.19788
rs1800470	Control	150	0.993	C	0.436	C	T	130	168	0.436	0.564	T/T	T/C	C/C	43	82	24	0.289	0.55	0.161	0.184844
rs1045485	RMJ	149	1	C	0.037	G	C	287	11	0.963	0.037	G/G	C/G	C/C	139	9	1	0.933	0.06	0.007	0.459124
rs1045485	Control	150	0.993	C	0.044	G	C	285	13	0.956	0.044	G/G	C/G		136	13		0.913	0.087		0.683764
rs139785364	RMJ	149	1	G	1	G		298		1		G/G			149			1			1
rs139785364	Control	150	1	G	1	G		300		1		G/G			150			1			1
rs13389423	RMJ	149	0.993	A	0.047	G	A	282	14	0.953	0.047	G/G	A/G		134	14		0.905	0.095		0.766263

Продолжение таблицы Б 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
rs13389423	Control	150	1	A	0.033	G	A	290	10	0.967	0.033	G/G	A/G		140	10		0.933	0.067		0.412936
rs111367604	RMJ	149	1	C	1	C		298		1		C/C			149			1			1
rs111367604	Control	150	1	C	1	C		300		1		C/C			150			1			1
rs2228455	RMJ	149	1	C	0.134	T	C	258	40	0.866	0.134	T/T	T/C		109	40		0.732	0.268		0.113484
rs2228455	Control	150	1	C	0.207	T	C	238	62	0.793	0.207	T/T	T/C		88	62		0.587	0.413		0.002855
rs13387042	RMJ	149	0.98	A	0.315	A	G	92	200	0.315	0.685	G/G	A/G	A/A	71	58	17	0.486	0.397	0.116	0.416558
rs13387042	Control	150	1	A	0.273	A	G	82	218	0.273	0.727	G/G	A/G	A/A	81	56	13	0.54	0.373	0.087	0.565499
rs17863783	RMJ	149	0.993	T	0.047	G	T	282	14	0.953	0.047	G/G	G/T	T/T	135	12	1	0.912	0.081	0.007	0.709252
rs17863783	Control	150	1	T	0.04	G	T	288	12	0.96	0.04	G/G	G/T		138	12		0.92	0.08		0.595269
rs3918242	RMJ	149	0.966	C	0.188	T	C	234	54	0.812	0.188	T/T	T/C		90	54		0.625	0.375		0.011143
rs3918242	Control	150	0.967	C	0.248	T	C	218	72	0.752	0.248	T/T	T/C		73	72		0.503	0.497		0.000147
rs8133052	RMJ	149	0.993	G	0.446	A	G	164	132	0.554	0.446	A/A	A/G	G/G	46	72	30	0.311	0.486	0.203	0.939443
rs8133052	Control	150	1	G	0.493	A	G	152	148	0.507	0.493	A/A	A/G	G/G	32	88	30	0.213	0.587	0.2	0.045139
rs17879961	RMJ	149	0.987	G	0.017	A	G	289	5	0.983	0.017	A/A	G/A	G/G	144	1	2	0.98	0.007	0.014	0
rs17879961	Control	150	0.98	G	0.003	A	G	293	1	0.997	0.003	A/A	G/A		146	1		0.993	0.007		0
rs6001930	RMJ	149	0.993	C	0.294	C	T	87	209	0.294	0.706	T/T	C/T	C/C	72	65	11	0.486	0.439	0.074	0.580665
rs6001930	Control	150	0.993	C	0.349	C	T	104	194	0.349	0.651	T/T	C/T	C/C	63	68	18	0.423	0.456	0.121	0.922657
rs3892097	RMJ	149	0.987	T	0.075	C	T	272	22	0.925	0.075	C/C	C/T	T/T	127	18	2	0.864	0.122	0.014	0.393184
rs3892097	Control	150	0.993	T	0.057	C	T	281	17	0.943	0.057	C/C	C/T		132	17		0.886	0.114		0.905011
rs1065852	RMJ	149	0.993	A	0.24	A	G	71	225	0.24	0.76	G/G	A/G	A/A	94	37	17	0.635	0.25	0.115	0.000271
rs1065852	Control	150	0.993	A	0.279	A	G	83	215	0.279	0.721	G/G	A/G	A/A	89	37	23	0.597	0.248	0.154	0.000007
rs4973768	RMJ	149	1	T	0.389	C	T	182	116	0.611	0.389	C/C	C/T	T/T	55	72	22	0.369	0.483	0.148	0.936163
rs4973768	Control	150	1	T	0.377	C	T	187	113	0.623	0.377	C/C	C/T	T/T	57	73	20	0.38	0.487	0.133	0.752267
rs4415084	RMJ	149	1	C	0.48	C	T	143	155	0.48	0.52	T/T	C/T	C/C	24	107	18	0.161	0.718	0.121	0
rs4415084	Control	150	1	C	0.467	T	C	160	140	0.533	0.467	T/T	C/T	C/C	32	96	22	0.213	0.64	0.147	0.000735
rs889312	RMJ	149	0.993	A	0.47	A	C	139	157	0.47	0.53	C/C	A/C	A/A	37	83	28	0.25	0.561	0.189	0.159447
rs889312	Control	150	1	C	0.42	A	C	174	126	0.58	0.42	A/A	A/C	C/C	44	86	20	0.293	0.573	0.133	0.041458
rs351855	RMJ	149	0.987	A	0.388	A	G	114	180	0.388	0.612	G/G	A/G	A/A	52	76	19	0.354	0.517	0.129	0.344025

Продолжение таблицы Б 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
rs351855	Control	150	1	A	0.333	A	G	100	200	0.333	0.667	G/G	A/G	A/A	62	76	12	0.413	0.507	0.08	0.115854
rs1143684	RMJ	149	0.987	C	0.184	T	C	240	54	0.816	0.184	T/T	C/T	C/C	96	48	3	0.653	0.327	0.02	0.397404
rs1143684	Control	150	0.993	C	0.215	T	C	234	64	0.785	0.215	T/T	C/T	C/C	91	52	6	0.611	0.349	0.04	0.818701
rs17530068	RMJ	149	1	C	0.195	T	C	240	58	0.805	0.195	T/T	C/T	C/C	94	52	3	0.631	0.349	0.02	0.244736
rs17530068	Control	150	1	C	0.2	C	T	60	240	0.2	0.8	T/T	C/T	C/C	95	50	5	0.633	0.333	0.033	0.762725
rs12210538	RMJ	149	1	G	0.094	A	G	270	28	0.906	0.094	A/A	A/G	G/G	122	26	1	0.819	0.174	0.007	0.869844
rs12210538	Control	150	1	G	0.103	A	G	269	31	0.897	0.103	A/A	A/G	G/G	121	27	2	0.807	0.18	0.013	0.921523
rs714368	RMJ	149	0.987	C	0.313	T	C	202	92	0.687	0.313	T/T	C/T	C/C	70	62	15	0.476	0.422	0.102	0.924724
rs714368	Control	150	0.987	C	0.355	T	C	191	105	0.645	0.355	T/T	C/T	C/C	59	73	16	0.399	0.493	0.108	0.420906
rs2046210	RMJ	149	1	A	0.315	G	A	204	94	0.685	0.315	G/G	A/G	A/A	72	60	17	0.483	0.403	0.114	0.497853
rs2046210	Control	150	0.993	A	0.289	G	A	212	86	0.711	0.289	G/G	A/G	A/A	74	64	11	0.497	0.43	0.074	0.684149
rs3798577	RMJ	149	1	C	0.436	C	T	130	168	0.436	0.564	T/T	C/T	C/C	42	84	23	0.282	0.564	0.154	0.097123
rs3798577	Control	150	0.993	C	0.409	C	T	122	176	0.409	0.591	T/T	C/T	C/C	53	70	26	0.356	0.47	0.174	0.823138
rs1045642	RMJ	149	1	A	0.466	G	A	159	139	0.534	0.466	G/G	A/G	A/A	46	67	36	0.309	0.45	0.242	0.290807
rs1045642	Control	150	1	A	0.407	G	A	178	122	0.593	0.407	G/G	A/G	A/A	53	72	25	0.353	0.48	0.167	0.939558
rs2032582	RMJ	149	0.946	A	0.408	C	A	167	115	0.592	0.408	C/C	C/A	A/A	55	57	29	0.39	0.404	0.206	0.071207
rs2032582	Control	150	1	A	0.423	C	A	173	127	0.577	0.423	C/C	C/A	A/A	58	57	35	0.387	0.38	0.233	0.00962
rs2740574	RMJ	149	1	C	0.013	T	C	294	4	0.987	0.013	T/T	C/T		145	4		0.973	0.027		0.00377
rs2740574	Control	150	1	C	0.01	T	C	297	3	0.99	0.01	T/T	C/T		147	3		0.98	0.02		0.000072
rs1799983	RMJ	149	0.98	T	0.199	G	T	234	58	0.801	0.199	G/G	G/T	T/T	94	46	6	0.644	0.315	0.041	0.911008
rs1799983	Control	150	1	T	0.153	G	T	254	46	0.847	0.153	G/G	G/T	T/T	108	38	4	0.72	0.253	0.027	0.941796
rs3218536	RMJ	149	0.973	T	0.162	C	T	243	47	0.838	0.162	C/C	C/T		98	47		0.676	0.324		0.038836
rs3218536	Control	150	1	T	0.233	C	T	230	70	0.767	0.233	C/C	C/T		80	70		0.533	0.467		0.000399
rs1054135	RMJ	149	0.725	T	0.347	T	C	75	141	0.347	0.653	C/C	C/T	T/T	51	39	18	0.472	0.361	0.167	0.051129
rs1054135	Control	150	0.94	T	0.379	C	T	175	107	0.621	0.379	C/C	C/T	T/T	55	65	21	0.39	0.461	0.149	0.902735
rs16902094	RMJ	149	0.987	G	0.272	A	G	214	80	0.728	0.272	A/A	A/G	G/G	77	60	10	0.524	0.408	0.068	0.835516
rs16902094	Control	150	1	G	0.27	A	G	219	81	0.73	0.27	A/A	A/G	G/G	81	57	12	0.54	0.38	0.08	0.779862
rs620861	RMJ	149	0.973	A	0.455	A	G	132	158	0.455	0.545	G/G	A/G	A/A	47	64	34	0.324	0.441	0.234	0.229963

Продолжение таблицы Б 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
rs620861	Control	150	1	A	0.45	A	G	135	165	0.45	0.55	G/G	A/G	A/A	47	71	32	0.313	0.473	0.213	0.678861
rs13281615	RMJ	149	1	G	0.463	A	G	160	138	0.537	0.463	A/A	A/G	G/G	42	76	31	0.282	0.51	0.208	0.84568
rs13281615	Control	150	1	G	0.453	A	G	164	136	0.547	0.453	A/A	A/G	G/G	46	72	32	0.307	0.48	0.213	0.790335
rs7853758	RMJ	149	1	A	0.104	G	A	267	31	0.896	0.104	G/G	A/G	A/A	119	29	1	0.799	0.195	0.007	0.869821
rs7853758	Control	150	1	A	0.097	A	G	29	271	0.097	0.903	G/G	A/G	A/A	122	27	1	0.813	0.18	0.007	0.918423
rs137852576	RMJ	149	0.946	A	0.379	G	A	175	107	0.621	0.379	G/G	A/G		34	107		0.241	0.759		0
rs137852576	Control	150	0.993	A	0.292	A	G	87	211	0.292	0.708	G/G	A/G		62	87		0.416	0.584		0.000001

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Ассоциативные связи генотипов с риском развития РМЖ

Таблица В 1

Rs	Модель наследования	Контрольная группа	РМЖ	ОШ 95%ДИ	p.value
1	2	3	4	5	6
rs11203289 (common)	Кодоминантный				
	G/G	88 (58.7%)	109 (73.2%)	1	0.0080510464
	G/C	62 (41.3%)	40 (26.8%)	0.52 [0.32-0.85]	
	Лог-Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.2%)	149 (49.8%)	0.52 [0.32-0.85]	
rs11203289 (minor)	Кодоминантный				
	G/G	88 (58.7%)	109 (73.2%)	1	0.0080510464
	G/C	62 (41.3%)	40 (26.8%)	0.52 [0.32-0.85]	
	Лог-Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.2%)	149 (49.8%)	0.52 [0.32-0.85]	
rs3918290 (common)	Кодоминантный				
	C/C	88 (58.7%)	109 (73.2%)	1	0.0080510464
	C/T	62 (41.3%)	40 (26.8%)	0.52 [0.32-0.85]	
	Лог-Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.2%)	149 (49.8%)	0.52 [0.32-0.85]	
rs3918290 (minor)	Кодоминантный				
	C/C	88 (58.7%)	109 (73.2%)	1	0.0080510464
	C/T	62 (41.3%)	40 (26.8%)	0.52 [0.32-0.85]	
	Лог-Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.2%)	149 (49.8%)	0.52 [0.32-0.85]	

Продолжение таблицы В 1

1	2	3	4	5	6
rs55886062 (common)	Кодоминантный				
	A/A	88 (58.7%)	108 (73%)	1	0.0090469196
	A/C	62 (41.3%)	40 (27%)	0.53 [0.32- 0.86]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.3%)	148 (49.7%)	0.53 [0.32- 0.86]	
rs55886062 (minor)	Кодоминантный				
	A/A	88 (58.7%)	108 (73%)	1	0.0090469196
	A/C	62 (41.3%)	40 (27%)	0.53 [0.32- 0.86]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.3%)	148 (49.7%)	0.53 [0.32- 0.86]	
rs7895676 (common)	Кодоминантный				
	T/T	75 (51%)	91 (63.6%)	1	0.0296524057
	T/C	72 (49%)	52 (36.4%)	0.6 [0.37-0.95]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	147 (50.7%)	143 (49.3%)	0.6 [0.37-0.95]	
rs7895676 (minor)	Кодоминантный				
	T/T	75 (51%)	91 (63.6%)	1	0.0296524057
	T/C	72 (49%)	52 (36.4%)	0.6 [0.37-0.95]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	147 (50.7%)	143 (49.3%)	0.6 [0.37-0.95]	
rs2981582 (common)	Кодоминантный				
	G/G	81 (58.7%)	10 (7.1%)	1	0
	A/G	44 (31.9%)	104 (73.8%)	19.15 [9.08- 40.35]	
	A/A	13 (9.4%)	27 (19.1%)	16.82 [6.62- 42.74]	

Продолжение таблицы В 1

1	2	3	4	5	6
	Доминантный				
	G/G	81 (58.7%)	10 (7.1%)	1	0
	A/G-A/A	57 (41.3%)	131 (92.9%)	18.62 [9- 38.51]	
	Рецессивный				
	G/G-A/G	125 (90.6%)	114 (80.9%)	1	0.0192408881
	A/A	13 (9.4%)	27 (19.1%)	2.28 [1.12- 4.63]	
	Сверх доминантный				
	G/G-A/A	94 (68.1%)	37 (26.2%)	1	0
	A/G	44 (31.9%)	104 (73.8%)	6 [3.58-10.09]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	138 (49.5%)	141 (50.5%)	5.57 [3.44- 9.02]	0
rs2981582 (minor)	Кодоминантный				
	A/A	13 (9.4%)	27 (19.1%)	1	0
	A/G	44 (31.9%)	104 (73.8%)	1.14 [0.54- 2.41]	
	G/G	81 (58.7%)	10 (7.1%)	0.06 [0.02- 0.15]	
	Доминантный				
	A/A	13 (9.4%)	27 (19.1%)	1	0.0192408881
	A/G-G/G	125 (90.6%)	114 (80.9%)	0.44 [0.22- 0.89]	
	Рецессивный				
	A/A-A/G	57 (41.3%)	131 (92.9%)	1	0
	G/G	81 (58.7%)	10 (7.1%)	0.05 [0.03- 0.11]	
	Сверх доминантный				
	A/A-G/G	94 (68.1%)	37 (26.2%)	1	0
	A/G	44 (31.9%)	104 (73.8%)	6 [3.58-10.09]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	138 (49.5%)	141 (50.5%)	0.18 [0.11- 0.29]	0

Продолжение таблицы В 1

1	2	3	4	5	6
rs1800057 (common)	Кодоминантный				
	C/C	88 (58.7%)	108 (73%)	1	0.0090469196
	C/G	62 (41.3%)	40 (27%)	0.53 [0.32- 0.86]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.3%)	148 (49.7%)	0.53 [0.32- 0.86]	
rs1800057 (minor)	Кодоминантный				
	C/C	88 (58.7%)	108 (73%)	1	0.0090469196
	C/G	62 (41.3%)	40 (27%)	0.53 [0.32- 0.86]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.3%)	148 (49.7%)	0.53 [0.32- 0.86]	
rs3092856 (common)	Кодоминантный				
	C/C	87 (58.4%)	107 (72.8%)	1	0.0089408666
	C/T	62 (41.6%)	40 (27.2%)	0.52 [0.32- 0.85]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	149 (50.3%)	147 (49.7%)	0.52 [0.32- 0.85]	
rs3092856 (minor)	Кодоминантный				
	C/C	87 (58.4%)	107 (72.8%)	1	0.0089408666
	C/T	62 (41.6%)	40 (27.2%)	0.52 [0.32- 0.85]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	149 (50.3%)	147 (49.7%)	0.52 [0.32- 0.85]	
rs1800058 (common)	Кодоминантный				
	C/C	63 (47.4%)	97 (67.8%)	1	0.0021184547
	C/T	67 (50.4%)	45 (31.5%)	0.44 [0.27- 0.71]	
	T/T	3 (2.3%)	1 (0.7%)	0.22 [0.02- 2.13]	

Продолжение таблицы В 1

1	2	3	4	5	6
	Доминантный				
	С/С	63 (47.4%)	97 (67.8%)	1	0.0005554796
	С/Т-Т/Т	70 (52.6%)	46 (32.2%)	0.43 [0.26-0.7]	
	Рецессивный				
	С/С-С/Т	130 (97.7%)	142 (99.3%)	1	0.2706041807
	Т/Т	3 (2.3%)	1 (0.7%)	0.31 [0.03-2.97]	
	Сверх домиантный				
	С/С-Т/Т	66 (49.6%)	98 (68.5%)	1	0.0013510847
	С/Т	67 (50.4%)	45 (31.5%)	0.45 [0.28-0.74]	
	Лог-Аддитивный				
	0,1,2	133 (48.2%)	143 (51.8%)	0.44 [0.28-0.7]	0.0004521617
rs1800058 (minor)	Кодоминантный				
	Т/Т	3 (2.3%)	1 (0.7%)	1	0.0021184547
	С/Т	67 (50.4%)	45 (31.5%)	2.01 [0.2-19.99]	
	С/С	63 (47.4%)	97 (67.8%)	4.62 [0.47-45.4]	
	Доминантный				
	Т/Т	3 (2.3%)	1 (0.7%)	1	0.2706041807
	С/Т-С/С	130 (97.7%)	142 (99.3%)	3.28 [0.34-31.9]	
	Рецессивный				
	Т/Т-С/Т	70 (52.6%)	46 (32.2%)	1	0.0005554796
	С/С	63 (47.4%)	97 (67.8%)	2.34 [1.44-3.82]	
	Сверх домиантный				
	Т/Т-С/С	66 (49.6%)	98 (68.5%)	1	0.0013510847
	С/Т	67 (50.4%)	45 (31.5%)	0.45 [0.28-0.74]	
	Лог-Аддитивный				
	0,1,2	133 (48.2%)	143 (51.8%)	2.27 [1.42-3.63]	0.0004521617

Продолжение таблицы В 1

1	2	3	4	5	6
rs2229774 (common)	Кодоминантный				
	G/G	131 (87.3%)	40 (27.2%)	1	0
	A/G	18 (12%)	107 (72.8%)	19.47 [10.56- 35.91]	
	A/A	1 (0.7%)	0 (0%)	0 [0-NA]	
	Доминантный				
	G/G	131 (87.3%)	40 (27.2%)	1	0
	A/G-A/A	19 (12.7%)	107 (72.8%)	18.44 [10.09- 33.7]	
	Рецессивный				
	G/G-A/G	149 (99.3%)	147 (100%)	1	1
	A/A	1 (0.7%)	0 (0%)	0 [0-NA]	
	Сверх доминантный				
	G/G-A/A	132 (88%)	40 (27.2%)	1	0
	A/G	18 (12%)	107 (72.8%)	19.62 [10.64- 36.17]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.5%)	147 (49.5%)	16.67 [9.22- 30.16]	0
rs2229774 (minor)	Кодоминантный				
	A/A	1 (0.7%)	0 (0%)	1	0
	A/G	18 (12%)	107 (72.8%)	NA [0-NA]	
	G/G	131 (87.3%)	40 (27.2%)	NA [0-NA]	
	Доминантный				
	A/A	1 (0.7%)	0 (0%)	1	1
	A/G-G/G	149 (99.3%)	147 (100%)	NA [0-NA]	
	Рецессивный				
	A/A-A/G	19 (12.7%)	107 (72.8%)	1	0
	G/G	131 (87.3%)	40 (27.2%)	0.05 [0.03-0.1]	
	Сверх доминантный				
	A/A-G/G	132 (88%)	40 (27.2%)	1	0

Продолжение таблицы В 1

1	2	3	4	5	6
	A/G	18 (12%)	107 (72.8%)	19.62 [10.64- 36.17]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.5%)	147 (49.5%)	0.06 [0.03- 0.11]	0
rs4987117 (common)	Кодоминантный				
	C/C	86 (57.3%)	109 (73.2%)	1	0.0039546992
	C/T	64 (42.7%)	40 (26.8%)	0.49 [0.3-0.8]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.2%)	149 (49.8%)	0.49 [0.3-0.8]	
rs4987117 (minor)	Кодоминантный				
	C/C	86 (57.3%)	109 (73.2%)	1	0.0039546992
	C/T	64 (42.7%)	40 (26.8%)	0.49 [0.3-0.8]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.2%)	149 (49.8%)	0.49 [0.3-0.8]	
rs1799954 (common)	Кодоминантный				
	C/C	87 (58%)	109 (73.2%)	1	0.0056749217
	C/T	63 (42%)	40 (26.8%)	0.51 [0.31- 0.82]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.2%)	149 (49.8%)	0.51 [0.31- 0.82]	
rs1799954 (minor)	Кодоминантный				
	C/C	87 (58%)	109 (73.2%)	1	0.0056749217
	C/T	63 (42%)	40 (26.8%)	0.51 [0.31- 0.82]	
	Лог- Аддитивная				
	0,1,2	150 (50.2%)	149 (49.8%)	0.51 [0.31- 0.82]	
rs80359062 (common)	Кодоминантный				

Продолжение таблицы В 1

1	2	3	4	5	6
	C/C	88 (58.7%)	109 (73.2%)	1	0.0080510464
	C/G	62 (41.3%)	40 (26.8%)	0.52 [0.32- 0.85]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.2%)	149 (49.8%)	0.52 [0.32- 0.85]	
rs80359062 (minor)	Кодоминантный				
	C/C	88 (58.7%)	109 (73.2%)	1	0.0080510464
	C/G	62 (41.3%)	40 (26.8%)	0.52 [0.32- 0.85]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.2%)	149 (49.8%)	0.52 [0.32- 0.85]	
rs11571747 (common)	Кодоминантный				
	A/A	88 (58.7%)	109 (73.2%)	1	0.0080510464
	A/C	62 (41.3%)	40 (26.8%)	0.52 [0.32- 0.85]	
	Лог- Аддитивная				
	0,1,2	150 (50.2%)	149 (49.8%)	0.52 [0.32- 0.85]	
rs11571747 (minor)	Кодоминантный				
	A/A	88 (58.7%)	109 (73.2%)	1	0.0080510464
	A/C	62 (41.3%)	40 (26.8%)	0.52 [0.32- 0.85]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.2%)	149 (49.8%)	0.52 [0.32- 0.85]	
rs11571833 (common)	Кодоминантный				
	A/A	88 (58.7%)	105 (71.9%)	1	0.0164229327
	A/T	62 (41.3%)	41 (28.1%)	0.55 [0.34-0.9]	
	Лог- Аддитивный				

Продолжение таблицы В 1

1	2	3	4	5	6
	0,1,2	150 (50.7%)	146 (49.3%)	0.55 [0.34-0.9]	
rs11571833 (minor)	Кодоминантный				
	A/A	88 (58.7%)	105 (71.9%)	1	0.0164229327
	A/T	62 (41.3%)	41 (28.1%)	0.55 [0.34-0.9]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.7%)	146 (49.3%)	0.55 [0.34-0.9]	
rs28934577 (common)	Кодоминантный				
	A/A	88 (58.7%)	108 (73%)	1	0.0090469196
	A/T	62 (41.3%)	40 (27%)	0.53 [0.32- 0.86]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.3%)	148 (49.7%)	0.53 [0.32- 0.86]	
rs28934577 (minor)	Кодоминантный				
	A/A	88 (58.7%)	108 (73%)	1	0.0090469196
	A/T	62 (41.3%)	40 (27%)	0.53 [0.32- 0.86]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.3%)	148 (49.7%)	0.53 [0.32- 0.86]	
rs62625308 (common)	Кодоминантный				
	G/G	88 (58.7%)	109 (73.2%)	1	0.0080510464
	G/A	62 (41.3%)	40 (26.8%)	0.52 [0.32- 0.85]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.2%)	149 (49.8%)	0.52 [0.32- 0.85]	
rs62625308 (minor)	Кодоминантный				
	G/G	88 (58.7%)	109 (73.2%)	1	0.0080510464
	G/A	62 (41.3%)	40 (26.8%)	0.52 [0.32- 0.85]	

Продолжение таблицы В 1

1	2	3	4	5	6
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.2%)	149 (49.8%)	0.52 [0.32- 0.85]	
rs1799950 (common)	Кодоминантный				
	T/T	146 (97.3%)	129 (90.2%)	1	0.0092796205
	C/T	4 (2.7%)	14 (9.8%)	3.96 [1.27- 12.34]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (51.2%)	143 (48.8%)	3.96 [1.27- 12.34]	
rs1799950 (minor)	Кодоминантный				
	T/T	146 (97.3%)	129 (90.2%)	1	0.0092796205
	C/T	4 (2.7%)	14 (9.8%)	3.96 [1.27- 12.34]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (51.2%)	143 (48.8%)	3.96 [1.27- 12.34]	
rs80357382 (common)	Кодоминантный				
	T/T	88 (58.7%)	105 (73.4%)	1	0.0075017882
	T/C	62 (41.3%)	38 (26.6%)	0.51 [0.31- 0.84]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (51.2%)	143 (48.8%)	0.51 [0.31- 0.84]	
rs80357382 (minor)	Кодоминантный				
	T/T	88 (58.7%)	105 (73.4%)	1	0.0075017882
	T/C	62 (41.3%)	38 (26.6%)	0.51 [0.31- 0.84]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (51.2%)	143 (48.8%)	0.51 [0.31- 0.84]	
rs137852985 (common)	Кодоминантный				
	C/C	136 (93.2%)	33 (25.6%)	1	0

Продолжение таблицы В 1

1	2	3	4	5	6
	Т/С	7 (4.8%)	91 (70.5%)	53.58 [22.72- 126.32]	
	Т/Т	3 (2.1%)	5 (3.9%)	6.87 [1.56- 30.2]	
	Доминантный				
	С/С	136 (93.2%)	33 (25.6%)	1	0
	Т/С-Т/Т	10 (6.8%)	96 (74.4%)	39.56 [18.61- 84.1]	
	Рецессивный				
	С/С-Т/С	143 (97.9%)	124 (96.1%)	1	0.3690184859
	Т/Т	3 (2.1%)	5 (3.9%)	1.92 [0.45-8.2]	
	Сверх доминантный				
	С/С-Т/Т	139 (95.2%)	38 (29.5%)	1	0
	Т/С	7 (4.8%)	91 (70.5%)	47.55 [20.36- 111.07]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	146 (53.1%)	129 (46.9%)	24.41 [12.3- 48.46]	0
rs137852985 (minor)	Кодоминантный				
	Т/Т	3 (2.1%)	5 (3.9%)	1	0
	Т/С	7 (4.8%)	91 (70.5%)	7.8 [1.54-39.6]	
	С/С	136 (93.2%)	33 (25.6%)	0.15 [0.03- 0.64]	
	Доминантный				
	Т/Т	3 (2.1%)	5 (3.9%)	1	0.3690184859
	Т/С-С/С	143 (97.9%)	124 (96.1%)	0.52 [0.12- 2.22]	
	Рецессивный				
	Т/Т-Т/С	10 (6.8%)	96 (74.4%)	1	0
	С/С	136 (93.2%)	33 (25.6%)	0.03 [0.01- 0.05]	
	Сверх доминантный				
	Т/Т-С/С	139 (95.2%)	38 (29.5%)	1	0
	Т/С	7 (4.8%)	91 (70.5%)	47.55 [20.36- 111.07]	
	Лог- Аддитивный				

Продолжение таблицы В 1

1	2	3	4	5	6
	0,1,2	146 (53.1%)	129 (46.9%)	0.04 [0.02-0.08]	0
rs1787991 (common)	Кодоминантный				
	G/G	74 (53.2%)	75 (67.6%)	1	0.0162633905
	G/T	65 (46.8%)	35 (31.5%)	0.53 [0.32-0.89]	
	T/T	0 (0%)	1 (0.9%)	NA [0-NA]	
	Доминантный				
	G/G	74 (53.2%)	75 (67.6%)	1	0.0212128913
	G/T-T/T	65 (46.8%)	36 (32.4%)	0.55 [0.33-0.92]	
	Рецессивный				
	G/G-G/T	139 (100%)	110 (99.1%)	1	0.444
	T/T	0 (0%)	1 (0.9%)	NA [0-NA]	
	Сверх домиантный				
	G/G-T/T	74 (53.2%)	76 (68.5%)	1	0.0141111357
	G/T	65 (46.8%)	35 (31.5%)	0.52 [0.31-0.88]	
	Лог-Аддитивный				
	0,1,2	139 (55.6%)	111 (44.4%)	0.58 [0.35-0.96]	0.0162633905
rs1787991 (minor)	Кодоминантный				
	T/T	0 (0%)	1 (0.9%)	1	0.0162633905
	G/T	65 (46.8%)	35 (31.5%)	0 [0-NA]	
	G/G	74 (53.2%)	75 (67.6%)	0 [0-NA]	
	Доминантный				
	T/T	0 (0%)	1 (0.9%)	1	0.444
	G/T-G/G	139 (100%)	110 (99.1%)	0 [0-NA]	
	Рецессивный				
	T/T-G/T	65 (46.8%)	36 (32.4%)	1	0.0212128913
	G/G	74 (53.2%)	75 (67.6%)	1.83 [1.09-3.07]	
	Сверх домиантный				

Продолжение таблицы В 1

1	2	3	4	5	6
	T/T-G/G	74 (53.2%)	76 (68.5%)	1	0.0141111357
	G/T	65 (46.8%)	35 (31.5%)	0.52 [0.31- 0.88]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	139 (55.6%)	111 (44.4%)	1.73 [1.04- 2.88]	0.0162633905
rs34945627 (common)	Кодоминантный				
	C/C	87 (58.8%)	107 (73.3%)	1	0.008467942
	C/T	61 (41.2%)	39 (26.7%)	0.52 [0.32- 0.85]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	148 (50.3%)	146 (49.7%)	0.52 [0.32- 0.85]	
rs34945627 (minor)	Кодоминантный				
	C/C	87 (58.8%)	107 (73.3%)	1	0.008467942
	C/T	61 (41.2%)	39 (26.7%)	0.52 [0.32- 0.85]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	148 (50.3%)	146 (49.7%)	0.52 [0.32- 0.85]	
rs757229 (common)	Кодоминантный				
	C/C	52 (34.7%)	51 (34.7%)	1	8.001e-07
	G/C	37 (24.7%)	72 (49%)	1.98 [1.14- 3.45]	
	G/G	61 (40.7%)	24 (16.3%)	0.4 [0.22-0.74]	
	Доминантный				
	C/C	52 (34.7%)	51 (34.7%)	1	0.9960695367
	G/C-G/G	98 (65.3%)	96 (65.3%)	1 [0.62-1.61]	
	Рецессивный				
	C/C-G/C	89 (59.3%)	123 (83.7%)	1	2.5832e-06
	G/G	61 (40.7%)	24 (16.3%)	0.28 [0.17- 0.49]	
	Сверх доминантный				

Продолжение таблицы В 1

1	2	3	4	5	6
	C/C-G/G	113 (75.3%)	75 (51%)	1	1.2123e-05
	G/C	37 (24.7%)	72 (49%)	2.93 [1.79-4.8]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.5%)	147 (49.5%)	0.68 [0.5-0.9]	0.0079255418
rs757229 (minor)	Кодоминантный				
	G/G	61 (40.7%)	24 (16.3%)	1	8.001e-07
	G/C	37 (24.7%)	72 (49%)	4.95 [2.67- 9.16]	
	C/C	52 (34.7%)	51 (34.7%)	2.49 [1.35- 4.59]	
	Доминантный				
	G/G	61 (40.7%)	24 (16.3%)	1	2.5832e-06
	G/C-C/C	89 (59.3%)	123 (83.7%)	3.51 [2.04- 6.06]	
	Рецессивный				
	G/G-G/C	98 (65.3%)	96 (65.3%)	1	0.9960695367
	C/C	52 (34.7%)	51 (34.7%)	1 [0.62-1.61]	
	Сверх доминантный				
	G/G-C/C	113 (75.3%)	75 (51%)	1	1.2123e-05
	G/C	37 (24.7%)	72 (49%)	2.93 [1.79-4.8]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.5%)	147 (49.5%)	1.48 [1.11- 1.98]	0.0079255418
rs12721655 (common)	Кодоминантный				
	A/A	88 (58.7%)	106 (72.6%)	1	0.0114053344
	A/G	62 (41.3%)	40 (27.4%)	0.54 [0.33- 0.87]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.7%)	146 (49.3%)	0.54 [0.33- 0.87]	
rs12721655 (minor)	Кодоминантный				

Продолжение таблицы В 1

1	2	3	4	5	6
	A/A	88 (58.7%)	106 (72.6%)	1	0.0114053344
	A/G	62 (41.3%)	40 (27.4%)	0.54 [0.33- 0.87]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.7%)	146 (49.3%)	0.54 [0.33- 0.87]	
rs3918242 (common)	Кодоминантный				
	T/T	73 (50.3%)	90 (62.5%)	1	0.0369433505
	T/C	72 (49.7%)	54 (37.5%)	0.61 [0.38- 0.97]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	145 (50.2%)	144 (49.8%)	0.61 [0.38- 0.97]	
rs3918242 (minor)	Кодоминантный				
	T/T	73 (50.3%)	90 (62.5%)	1	0.0369433505
	T/C	72 (49.7%)	54 (37.5%)	0.61 [0.38- 0.97]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	145 (50.2%)	144 (49.8%)	0.61 [0.38- 0.97]	
rs889312 (common)	Кодоминантный				
	A/A	44 (29.3%)	28 (18.9%)	1	0.0124417313
	A/C	86 (57.3%)	83 (56.1%)	1.52 [0.86- 2.66]	
	C/C	20 (13.3%)	37 (25%)	2.91 [1.41- 5.98]	
	Доминантный				
	A/A	44 (29.3%)	28 (18.9%)	1	0.0351103098
	A/C-C/C	106 (70.7%)	120 (81.1%)	1.78 [1.04- 3.06]	
	Рецессивный				
	A/A-A/C	130 (86.7%)	111 (75%)	1	0.0100038635
	C/C	20 (13.3%)	37 (25%)	2.17 [1.19- 3.95]	
	Сверх доминантный				

Продолжение таблицы В 1

1	2	3	4	5	6
	A/A-C/C	64 (42.7%)	65 (43.9%)	1	0.8273177615
	A/C	86 (57.3%)	83 (56.1%)	0.95 [0.6-1.5]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.3%)	148 (49.7%)	1.69 [1.18- 2.42]	0.0034843232
rs889312 (minor)	Кодоминантный				
	C/C	20 (13.3%)	37 (25%)	1	0.0124417313
	A/C	86 (57.3%)	83 (56.1%)	0.52 [0.28- 0.97]	
	A/A	44 (29.3%)	28 (18.9%)	0.34 [0.17- 0.71]	
	Доминантный				
	C/C	20 (13.3%)	37 (25%)	1	0.0100038635
	A/C-A/A	130 (86.7%)	111 (75%)	0.46 [0.25- 0.84]	
	Рецессивный				
	C/C-A/C	106 (70.7%)	120 (81.1%)	1	0.0351103098
	A/A	44 (29.3%)	28 (18.9%)	0.56 [0.33- 0.97]	
	Сверх доминантный				
	C/C-A/A	64 (42.7%)	65 (43.9%)	1	0.8273177615
	A/C	86 (57.3%)	83 (56.1%)	0.95 [0.6-1.5]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.3%)	148 (49.7%)	0.59 [0.41- 0.85]	0.0034843232
rs3218536 (common)	Кодоминантный				
	C/C	80 (53.3%)	98 (67.6%)	1	0.0121452714
	C/T	70 (46.7%)	47 (32.4%)	0.55 [0.34- 0.88]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.8%)	145 (49.2%)	0.55 [0.34- 0.88]	
rs3218536 (minor)	Кодоминантный				

Продолжение таблицы В 1

1	2	3	4	5	6
	C/C	80 (53.3%)	98 (67.6%)	1	0.0121452714
	C/T	70 (46.7%)	47 (32.4%)	0.55 [0.34- 0.88]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	150 (50.8%)	145 (49.2%)	0.55 [0.34- 0.88]	
rs137852576 (common)	Кодоминантный				
	G/G	62 (41.6%)	34 (24.1%)	1	0.0014576535
	A/G	87 (58.4%)	107 (75.9%)	2.24 [1.35- 3.72]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	149 (51.4%)	141 (48.6%)	2.24 [1.35- 3.72]	
rs137852576 (minor)	Кодоминантный				
	G/G	62 (41.6%)	34 (24.1%)	1	0.0014576535
	A/G	87 (58.4%)	107 (75.9%)	2.24 [1.35- 3.72]	
	Лог- Аддитивный				
	0,1,2	149 (51.4%)	141 (48.6%)	2.24 [1.35- 3.72]	

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

АКТ

СОГЛАСОВАНО

Руководитель Актюбинского
Областного управления
Здравоохранения



/ Р.К.Исаев

7 12 2022 г.

СОГЛАСОВАНО

Проректор по стратегическому развитию,
науке и международному сотрудничеству,
член Правления ЗКМУ имени Марата Оспанова



С.С.Сапарбаев

2 12 2022 г.

АКТ №

внедрения научно-исследовательской работы
на кафедре онкологии

НАО Западно-Казахстанский медицинский университет имени Марата Оспанова
(наименование учреждения, где внедряется работа)

Наименование предложения: «Оценка ответа на химиотерапию методом мониторинга двухпочечных разрывов ДНК (γ -H2AX) в лимфоцитах у больных с раком молочной железы»

Работа включена из: научно-исследовательского плана диссертационной работы в инициативном порядке.

Форма внедрения: В учебный процесс для студентов интернов «Общей медицины» по дисциплине «Онкология в ОВП» для 6 курса и «Введение онкологических больных в ПМСП» для 7 курса в практические занятия.

Ответственный за внедрение и исполнитель: Айтмагамбетова М.А.

Эффективность внедрения: научно-исследовательская.

Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение результатов научно-исследовательской работы в учебный процесс могут в дальнейшем повлиять на исследовательский интерес и получения углубленной информации об онкологическом процессе на уровне двухнитевых разрывов ДНК у студентов интернов Общей медицины.

Срок внедрения: февраль 2022г.

Председатель комиссии: Койшыбаев А.К.

Члены (ответственные за внедрение): Айтмагамбетова М.А.,

Туляева А.Б.,

Балмагамбетова С.К.,

Дюсембеков С.Т.,

Керева Н.М.,

Жолмухамедова Д.А.

Исполнитель: Айтмагамбетова М.А.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Свидетельство

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН



СВИДЕТЕЛЬСТВО
О ВНЕСЕНИИ СВЕДЕНИЙ В ГОСУДАРСТВЕННЫЙ РЕЕСТР
ПРАВ НА ОБЪЕКТЫ, ОХРАНЯЕМЫЕ АВТОРСКИМ ПРАВОМ
№ 21057 от «21» октября 2021 года

Фамилия, имя, отчество, (если оно указано в документе, удостоверяющем личность) автора (ов):
АЙТМАТАМБЕТОВА МАРЖАН АЛТЫНБЕКОВНА, Смагулова Газиза Ажмагиевна, Завалённая Оксана Владимировна, Туляева Анар Балкашевна

Вид объекта авторского права: **произведение науки**

Название объекта: **A clinical case of diagnosis of breast cancer in patients with family history of BRCA mutations 1**

Дата создания объекта: **07.06.2021**





Құжат түпнұсқасын <http://www.kazpatent.kz/ru> сайтының
"Авторлық құқық" бөлімінде тексеруге болады <https://copyright.kazpatent.kz>

Подлинность документа возможно проверить на сайте kazpatent.kz
в разделе «Авторское право» <https://copyright.kazpatent.kz>

Подписано ЭЦП

Оспанов Е.К.

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

СВИДЕТЕЛЬСТВО

О ВНЕСЕНИИ СВЕДЕНИЙ В ГОСУДАРСТВЕННЫЙ РЕЕСТР ПРАВ НА ОБЪЕКТЫ, ОХРАНЯЕМЫЕ АВТОРСКИМ ПРАВОМ

№ 38220 от «2» августа 2023 года

Фамилия, имя, отчество, (если оно указано в документе, удостоверяющем личность) автора (ов):
АЙТМАГАМБЕТОВА МАРЖАН АЛТЫНБЕКОВНА, Смагулова Газиза Ажмагиевна, Саханова Светлана
Калиулдаевна, Кереева Нургуль Мейримовна, Койшыбаев Арип Кубекович, Аманжолқызы Айнур,
Кандыгулова Гульнара Жулдыкаировна

Вид объекта авторского права: произведение науки

Название объекта: The γ -H2AX foci as an indicator for double-stranded DNA breaks and response to ongoing
chemotherapy in breast cancer women: a pilot study

Дата создания объекта: 28.07.2023



Құжат тұлғасқалығын <http://www.kazpatent.kz/ru> сайтының
"Авторлық құқық" Бөлімінде тексеруге болады <https://copyright.kazpatent.kz>

Подлинность документа возможно проверить на сайте kazpatent.kz
в разделе «Авторское право» <https://copyright.kazpatent.kz>

Подписано ЭЦП

А. Артыкова