

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2771421

Способ прогнозирования клинического течения нейроэндокринных новообразований толстой кишки

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

Авторы: *Кит Олег Иванович (RU), Колесников Евгений Николаевич (RU), Трифанов Владимир Сергеевич (RU), Гвалдин Дмитрий Юрьевич (RU), Мещерякова Милана Юрьевна (RU)*

Заявка № 2021122507

Приоритет изобретения 28 июля 2021 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 04 мая 2022 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 28 июля 2041 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/574 (2022.02); C12Q 1/68 (2022.02)

(21)(22) Заявка: 2021122507, 28.07.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.07.2021

Дата регистрации:
04.05.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.07.2021

(45) Опубликовано: 04.05.2022 Бюл. № 13

Адрес для переписки:

344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я Линия, 63,
ФГБУН МИЦО МЗ РФ, Ишонина О.Г.

(72) Автор(ы):

Кит Олег Иванович (RU),
Колесников Евгений Николаевич (RU),
Трифанов Владимир Сергеевич (RU),
Гвалдин Дмитрий Юрьевич (RU),
Мещерякова Милана Юрьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
учреждение «Национальный медицинский
исследовательский центр онкологии»
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2647470 C2, 15.03.2018.

КУСТОВА И.Ф. и др. Потенциал
использования биомаркеров метилирования
для диагностики и прогноза
гепатоцеллюлярной карциномы методом
жидкостной биопсии / Успехи молекулярной
онкологии, 2018, 5(4), стр. 8-19. КВАША С.М.
Современные методические подходы к
определению статуса метилирования ДНК и
их применение в онкологии / (см. прод.)

(54) Способ прогнозирования клинического течения нейроэндокринных новообразований толстой кишки

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к области генетики и молекулярной онкологии, и касается способа прогнозирования клинического течения нейроэндокринных новообразований толстой кишки. Способ включает отбор биопсийного материала, выделение тотальной ДНК из тканевых проб с помощью метода фенол-хлороформной экстракции, бисульфитное конвертирование ДНК с последующим использованием её в качестве матрицы для амплификации участков регуляторных районов в присутствии ген-специфичных праймеров, пиросеквенирование полученных ампликонов в присутствии

специфичного праймера, определение метилирования промоторного участка гена. При статусе метилирования Met_{LINE1} более 72%, Met_{APC1} менее 11%, Met_{MGMT} менее 10,5%, Met_{RASSF1A} менее 12% и Met_{RUNX3} менее 10% следует ожидать благоприятное клиническое течение заболевания, при значениях Met_{LINE} меньше или равно 72%, Met_{APC1} больше или равно 11%, Met_{MGMT} больше или равно 10,5%, Met_{RASSF1A} больше или равно 12% и Met_{RUNX3} больше или равно 10%, напротив, следует ожидать неблагоприятное течение заболевания.

Изобретение позволяет на дооперационном этапе выделять две категории пациентов на основании благоприятного и неблагоприятного прогноза

клинического течения заболевания и определять рациональную тактику ведения пациента. 2 пр.

(56) (продолжение):

Укр. б ох м. журн., 2008, т. 80, N 4, стр. 5-15. STRICKER I. et al. Site- and Grade-specific Diversity of LINE1 methylation Pattern in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumours / ANTICANCER RESEARCH, 2012, 32, pages 3699-3706. LIM J.Y. et al. Clinical Features, Management, and Molecular Characteristics of Familial Small Bowel Neuroendocrine Tumors / Frontiers in Endocrinology, 26 February 2021, Volume 12, Article 622693.

RU 2 7 7 1 4 2 1 C 1

RU 2 7 7 1 4 2 1 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)
(51) Int. Cl.
G01N 33/574 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

2 771 421 ⁽¹³⁾ **C1**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 33/574 (2022.02); *C12Q 1/68* (2022.02)

(21)(22) Application: **2021122507, 28.07.2021**

(24) Effective date for property rights:
28.07.2021

Registration date:
04.05.2022

Priority:

(22) Date of filing: **28.07.2021**

(45) Date of publication: **04.05.2022** Bull. № 13

Mail address:

**344037, g. Rostov-na-Donu, ul. 14-ya Liniya, 63,
FGBUN MITSO MZ RF, Ishonina O.G.**

(72) Inventor(s):

**Kit Oleg Ivanovich (RU),
Kolesnikov Evgenii Nikolaevich (RU),
Trifanov Vladimir Sergeevich (RU),
Gvaldin Dmitrii Iurevich (RU),
Meshcheriakova Milana Iurevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe biudzhethnoe
uchrezhdenie «Natsionalnyi meditsinskii
issledovatel'skii tsentr onkologii» Ministerstva
zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii (RU)**

(54) **METHOD FOR PREDICTING THE CLINICAL COURSE OF NEUROENDOCRINE NEOPLASMS OF THE COLON**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, namely to the field of genetics and molecular oncology, and concerns a method for predicting the clinical course of neuroendocrine neoplasms of the colon. The method includes the selection of biopsy material, isolation of total DNA from tissue samples using the method for phenol-chloroform extraction, bisulfite conversion of DNA, followed by its use as a matrix for amplification of regulatory regions in the presence of gene-specific primers, pyrosequencing of the obtained amplicons in the presence of a specific primer, determination of methylation of the promoter region of the gene. If the methylation status of Met_{LINE1} is more than 72%, Met_{APC1} is less than 11%, Met_{MGMT} is less than 10.5%,

Met_{RASSF1A} is less than 12% and Met_{RUNX3} is less than 10%, a favorable clinical course of the disease should be expected, with Me_{LINE} values less than or equal to 72%, Met_{APC1} is greater than or equal to 11%, Met_{MGMT} is greater than or equal to 10.5%, Met_{RASSF1A} is greater than or equal to 12% and Met_{RUNX3} is greater than or equal to 10%, on the contrary, an unfavorable course of the disease should be expected.

EFFECT: invention makes it possible to distinguish two categories of patients at the preoperative stage on the basis of a favorable and unfavorable prognosis of the clinical course of the disease and to determine the rational tactics of patient management.

1 cl, 2 ex

Изобретение относится к медицине, а именно к области генетики и молекулярной онкологии, и касается способа прогнозирования клинического течения нейроэндокринных новообразований толстой кишки.

Нейроэндокринные новообразования толстой кишки представляют собой группу
 5 опухолей с различными клинико-патологическими характеристиками (Tirosh A, Killian JK, Petersen D, Zhu YJ, Walker RL, Blau JE, Nilubol N, Patel D, Agarwal SK, Weinstein LS, Meltzer P, Kebebew E. Distinct DNA Methylation Signatures in Neuroendocrine Tumors Specific for Primary Site and Inherited Predisposition. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020 Oct 1;105(10): dgaa477. doi: 10.1210/clinem/dgaa477. PMID: 32706863; PMCID: PMC7456345). Как в
 10 Российской Федерации, так и зарубежом, в области НЭН толстой кишки до сих не проводилось масштабных эпигенетических и молекулярно-генетических исследований. Тем не менее со стороны клиницистов интерес к данной группе неоплазий не ослабевает (Lakis V, Lawlor RT, Newell F, Patch AM, Mafficini A, Sadanandam A, Koufariotis LT, Johnston RL, Leonard C, Wood S, Rusev B, Corbo V, Luchini C, Cingarlini S, Landoni L, Salvia R, Milella
 15 M, Chang D, Bailey P, Jamieson NB, Duthie F, Gingras MC, Muzny DM, Wheeler DA, Gibbs RA, Milione M; APGI; ARC-Net, Pederzoli P, Samra JS, Gill AJ, Johns AL, Pearson JV, Biankin AV, Grimmond SM, Waddell N, Nones K, Scarpa A. DNA methylation patterns identify subgroups of pancreatic neuroendocrine tumors with clinical association. *Commun Biol.* 2021 Feb 3;4(1): 155. doi: 10.1038/s42003-020-01469-0. PMID: 33536587; PMCID: PMC7859232). В отсутствии
 20 специфических лабораторных биомаркеров сложность составляет прогнозирование клинического течения НЭН толстой кишки, выбор тактики лечения (Della Monica R, Cuomo M, Visconti R, di Mauro A, Buonaiuto M, Costabile D, De Riso G, Di Risi T, Guadagno E, Tafuto R, Lamia S, Ottaiano A, Cappabianca P, Del Basso de Caro ML, Tatangelo F, Hench J, Frank S, Tafuto S, Chiariotti L. Evaluation of MGMT gene methylation in neuroendocrine
 25 neoplasms. *Oncol Res.* 2021 May 20. doi: 10.3727/096504021X16214197880808. Epub ahead of print. PMID: 34016221; Colao A, de Nigris F, Modica R, Napoli C. Clinical Epigenetics of Neuroendocrine Tumors: The Road Ahead. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020 Dec 15;11:604341. doi: 10.3389/fendo.2020.604341. PMID: 33384663; PMCID: PMC7770585).

Известно, что наряду с изменением структуры ДНК вследствие генетических мутаций,
 30 большое значение для патогенеза опухолей имеют и эпигенетические альтерации (Mitsuhashi K, Yamamoto I, Kurihara H, Kanno S, Ito M, Igarashi H, Ishigami K, Sukawa Y, Tachibana M, Takahashi H, Tokino T, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Yamamoto H, Noshio K. Analysis of the molecular features of rectal carcinoid tumors to identify new biomarkers that predict biological malignancy. *Oncotarget.* 2015 Sep 8;6(26):22114-25. doi:
 35 10.18632/oncotarget.4294. PMID: 26090613; PMCID: PMC4673150). Фенотип метилирования CpG-островков в зависимости от гистологического типа опухоли может быть связан как с положительным, так и с отрицательным прогнозом (Furlan D, Sahnane N, Mazzoni M, Pastorino R, Carnevali I, Stefanoli M, Ferretti A, Chiaravalli AM, La Rosa S, Capella C. Diagnostic utility of MS-MLPA in DNA methylation profiling of adenocarcinomas and
 40 neuroendocrine carcinomas of the colon-rectum. *Virchows Arch.* 2013 Jan;462(1):47-56. doi: 10.1007/s00428-012-1348-2. Epub 2012 Dec 9. PMID: 23224118; Karpathakis A, Dibra H, Thirlwell C. Neuroendocrine tumours: cracking the epigenetic code. *Endocr Relat Cancer.* 2013 May 20;20(3):R65-82. doi: 10.1530/ERC-12-0338. PMID: 23429748). Wang Y. et al. в 2020 году опубликовали результаты изучения полногеномного метилирования ДНК с
 45 попыткой создания математической модели колоректального рака, основанной только на эпигенетических характеристиках опухоли без учета клинических характеристик (Wang Y, Zhang M, Hu X, Qin W, Wu H, Wei M. Colon cancer-specific diagnostic and prognostic biomarkers based on genome-wide abnormal DNA methylation. *Aging (Albany NY).* 2020 Nov

17;12(22):22626-22655. doi: 10.18632/aging.103874. Epub 2020 Nov 17. PMID: 33202377; PMCID: PMC7746390).

Обширный поиск не выявил зарегистрированного способа мониторинга клинического течения нейроэндокринных неоплазий толстой кишки. Из литературных источников известна работа Ohki и соавторов, где сообщалось, что потеря гетерозиготности онкосупрессора PHLDA3 ассоциирована с неблагоприятным прогнозом и высоким риском метастазирования нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы (Ohki R, Saito K, Chen Y, Kawase T, Hiraoka N, Saigawa R, Minegishi M, Aita Y, Yanai G, Shimizu H, Yachida S, Sakata N, Doi R, Kosuge T, Shimada K, Tycko B, Tsukada T, Kanai Y, Sumi S, Namiki H, Taya Y, Shibata T, Nakagama H. PHLDA3 is a novel tumor suppressor of pancreatic neuroendocrine tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Jun 10;111(23):E2404-13. doi: 10.1073/pnas.1319962111. Epub 2014 May 27. PMID: 24912192; PMCID: PMC4060701). Позднее Kojima и соавторы проверили наличие данной ассоциации в случае ректальных НЭН (Kojima M, Chen Y, Ikeda K, Tsukada Y, Takahashi D, Kawano S, Amemiya K, Ito M, Ohki R, Ochiai A. Recommendation of long-term and systemic management according to the risk factors in rectal NETs patients. Sci Rep. 2019 Feb 20;9(1):2404. doi: 10.1038/s41598-018-37707-z. PMID: 30787304; PMCID: PMC6382938). Авторы исследовали потерю гетерозиготности в генах MEN1 и PHLDA3 у 79 пациентов японской популяции с ректальными НЭН. Выборка пациентов была представлена 58 (73,4%) мужчинами и 21 (26,6%) женщиной. Средний возраст составил 58,5±12,8 лет. По гистоморфологическим характеристикам 72 (91,1%) опухолевых образца имели признаки НЭН G1, 7 (8,9%) – признаки НЭН G2. Лимфатическая инвазия составила 16,5% случаев, рецидив отмечен в 3,8% случаев. Авторами было показано, что лимфатическая инвазия является независимым риском метастазирования лимфатических узлов, а потеря гетерозиготности PHLDA3 ассоциирована с наличием нескольких первично множественных опухолей ($p = 0,02$). Несмотря на то, что потеря гетерозиготности PHLDA3 является эффективным прогностическим маркером клинического течения НЭН поджелудочной железы, данный показатель не позволяет оценить риски лимфатической инвазии и возможного метастазирования в случае ректальных НЭН.

Тем не менее, определение статуса метилирования генов давно зарекомендовало себя как метод диагностики различных онкозаболеваний.

В качестве прототипа был выбран способ диагностики колоректального рака, основанный на определении статуса метилирования BOLL, CDX1, CLIC4, DCC, ESR1, GATA4, GDNF, HLA-G, JUB, MYOD1, NKX2-1, PENK, PITX2, PTGS2, RARB, S100A2, SALL3, SEZ6L, SFRP2, SPARC, TCEB2, TFPI2, THEBD, TJP2, TMEFF2, TP53, TWIST1, WT1 (US 2016/0355885 A1). Метод предполагает использование технологии RT-PCR или microarray для определения статуса метилирования вышеперечисленных генов. Данные о метилировании необходимо загрузить в классификатор, разработанный на основе байесовской модели, для получения сведений об образцах - наличие или отсутствие колоректального рака. Такой способ имеет несколько недостатков:

1. Большой набор генов, необходимых для исследования.
2. Обучение и постоянное обновление модели, лежащей в основе классификатора.
3. Точность способа зависит от числа и определенных сочетаний генов с высоким процентом метилирования и может сильно варьировать.

Изобретение «Способ прогнозирования клинического течения нейроэндокринных новообразований толстой кишки» является новым, так как изучение прогностической роли статуса метилирования 8 генов-онкосупрессоров *AHR*, *APCA*, *DAPK*, *MGMT*, *MLH1*, *PI6*, *RASSF1A*, *RUNX3* и ретротранспозона *LINE1* ранее не использовалось для

прогнозирования клинического течения НЭН толстой кишки.

Задачей изобретения является определение различных молекулярных подтипов нейроэндокринных новообразований толстой кишки на дооперационном этапе для прогноза клинического течения заболевания.

5 Техническим результатом является разработка способа прогнозирования клинического течения нейроэндокринных новообразований толстой кишки.

Технический результат достигается тем, что у пациента производят забор биопсийного образца опухолевой ткани, образцы замораживают в жидком азоте для транспортировки в лабораторию и для хранения, выделение геномной ДНК из ткани проводят следующим
10 образом: фрагменты ткани измельчают скальпелем и/или ножницами, помещают в лизирующий раствор, дальнейшее выделение ДНК проводят по методу фенол-хлороформной экстракции, выделенную ДНК обрабатывают в ходе бисульфитной конверсии с помощью набора EpiJET Bisulfite Conversion Kit, Thermo Scientific, анализируемые последовательности генетических локусов амплифицируют в 35 мкл
15 ПЦР-смеси, содержащей 1х ПЦР-буфер, 0,2 mM dNTPs, MgCl₂, 1 ед. акт. Taq-DNA-полимеразы, по 0,4 мкМ прямого и обратного праймеров. амплификацию проводят на термоциклере в соответствии с инструкциями производителя по следующей программе: первичная денатурация: 95°C 5 мин, 45 циклов: 95°C 20 с; 72°C 20 с. терминальное удлинение цепи 72°C 10 мин, ампликоны, полученные после постановки ПЦР на матрице
20 бисульфит-конвертированной ДНК, подвергают очистке, денатурации и отмывке с последующим отжигом с секвенирующим праймером при 80°C и постановкой реакции пиросеквенирования с использованием системы генетического анализа PyroMark Q24, Qiagen, Germany согласно инструкции производителя, постановку пиросеквенирования каждого образца проводят, как минимум, в двух повторах, полученные данные
25 анализируют с помощью программного обеспечения PyroMark Q24 Software, Qiagen, Germany, значение метилирования отдельного CpG-сайта используют для вычисления усредненного метилирования промоторного участка каждого гена (Met, %), при статусе метилирования Met_{LINE1} более 72%, Met_{APC1} менее 11%, Met_{MGMT} менее 10,5%, Met_{RASSF1A} менее 12% и Met_{RUNX3} менее 10% следует ожидать благоприятного
30 клинического течения нейроэндокринных новообразований толстой кишки, а при значениях Met_{LINE} меньше или равно 72%, Met_{APC1} больше или равно 11%, Met_{MGMT} больше или равно 10,5%, Met_{RASSF1A} больше или равно 12% и Met_{RUNX3} больше или равно 10%, напротив, следует ожидать неблагоприятного клинического течения
35 нейроэндокринных новообразований толстой кишки.

Способ основан на феномене эпигенетических изменений ДНК, заключающихся в метилировании определенных регуляторных сайтов генов, что способствует инициации неопластического процесса.

Заявленный способ включает следующие этапы: отбор биопсийного материала, выделение тотальной ДНК из тканевых проб с помощью метода фенол-хлороформной
40 экстракции; бисульфитное конвертирование ДНК с последующим использованием её в качестве матрицы для амплификации участков регуляторных районов в присутствии ген-специфичных праймеров; пиросеквенирование полученных ампликонов в присутствии специфичного праймера; статистическая обработка данных на соответствие
45 контрольным значениям уровня метилирования, рассчитанным на основании экспериментальных данных для условно нормальных и опухолевых тканей толстой кишки.

Заявляемый способ осуществляется следующим образом.

У пациента производят забор биопсийного образца опухолевой ткани. Образцы замораживают в жидком азоте для транспортировки в лабораторию и для хранения.

Выделение геномной ДНК из ткани проводят следующим образом: фрагменты ткани измельчают скальпелем и/или ножницами, помещают в лизирующий раствор.

5 Дальнейшее выделение ДНК проводят по методу фенол-хлороформной экстракции.

Выделенную ДНК обрабатывают в ходе бисульфитной конверсии с помощью набора EpiJET Bisulfite Conversion Kit (Thermo Scientific).

10 Анализируемые последовательности генетических локусов амплифицируют в 35 мкл ПЦР-смеси, содержащей 1х ПЦР-буфер, 0,2 mM dNTPs, MgCl₂, 1 ед. акт. Taq-DNA-полимеразы, по 0,4 мкМ прямого и обратного праймеров.

Амплификацию проводят на термоциклере в соответствии с инструкциями производителя по следующей программе:

- первичная денатурация: 95°C 5 мин.
- 45 циклов:
- 15 - 95°C 20 с;
- 72°C 20 с.
- терминальное удлинение цепи 72°C 10 мин.

20 Ампликоны, полученные после постановки ПЦР на матрице бисульфит-конвертированной ДНК, подвергают очистке, денатурации и отмывке с последующим отжигом с секвенирующим праймером при 80°C и постановкой реакции пиросеквенирования с использованием системы генетического анализа PyroMark Q24 (Qiagen, Germany) согласно инструкции производителя. Постановку пиросеквенирования каждого образца проводят, как минимум, в двух повторах. Полученные данные анализируют с помощью программного обеспечения PyroMark Q24 Software (Qiagen, 25 Germany). Значение метилирования отдельного CpG-сайта используют для вычисления усредненного метилирования промоторного участка каждого гена (Met, %).

Вывод об изменении статуса метилирования делают, сравнивая значения Met, полученные для опухоли, с контрольным значением. Под контрольным значением понимают нижнюю границу 95%-ого доверительного интервала, вычисленного для 30 опухолей толстой кишки, гиперметилированных по исследованному локусу. Генетический локус признают гиперметилированным, если вычисленное Met равно или превышает контрольное значение.

35 Считая пороговое значение для метилирования промоторного региона гена показатель 10%, было установлено, что наиболее часто в статусе гиперметилирования находились гены *APC*, *RASSF1A*, *RUNX3*, *MGMT* и, соответственно, гипометилирования - *DAPK*, *MLH1*, *AHR*, *P16*. Благоприятное клиническое течение наблюдали в случаях НЭН толстой кишки со следующими показателями: Met_{LINE1} > 72%, Met_{APC1} < 11%, Met_{MGMT} < 10,5%, Met_{RASSF1A} < 12% и Met_{RUNX3} < 10%. Напротив, при значениях Met_{LINE1} ≤ 72%, Met_{APC1} ≥ 11%, Met_{MGMT} ≥ 10,5%, Met_{RASSF1A} ≥ 12% и Met_{RUNX3} ≥ 10% 40 НЭН толстой кишки характеризовались неблагоприятным исходом заболевания.

Работоспособность заявляемого способа подтверждается следующими клиническими примерами:

Пример №1

45 Пациентка Б., 75 лет, считала себя больной с февраля 2016 года, когда появились жалобы на нарушение стула по типу запоров. В июле 2016 года в лечебно-профилактическом учреждении по месту жительства была выполнена колоноскопия с биопсией, на которой был визуализирован полип прямой кишки. Гистологическое

закключение содержало описание хронического воспаления в стенке кишки с гиперсекрецией слизи. Было рекомендовано эндоскопическое электрохирургическое удаление полипа. Патоморфологическое заключение исследования операционного материала указывало на наличие низкодифференцированной нейроэндокринной карциномы солидного строения с глубоким инвазивным ростом в подслизистом слое. Диагноз был подтвержден иммуногистохимическим методом, значение Ki-67 45%. В послеоперационном периоде пациентка была дообследована в НМИЦ онкологии г. Ростов-на-Дону. По данным МРТ органов малого таза в прямой кишке на уровне нижне-ампулярного отдела и анального канала отмечалось циркулярное утолщение стенок до 0,8 см. На ПЭТ-КТ в прямой кишке отчетливо визуализировалась очаговая активность злокачественного характера. По данным молекулярно-генетического исследования в опухоли отмечалось гипометилирование генов *APC1*, *MGMT*, *RASSF1A*, *RUNX3* и гиперметилирование ретротранспозона *LINE-1* ($\text{Met}_{\text{LINE1}} > 72\%$, $\text{Met}_{\text{APC1}} < 11\%$, $\text{Met}_{\text{MGMT}} < 10,5\%$, $\text{Met}_{\text{RASSF1A}} < 12\%$ и $\text{Met}_{\text{RUNX3}} < 10\%$). Прогнозируя благоприятное течение заболевания на основании эпигенетического статуса опухоли, пациентке было предложено проведение консервативного лечения и диспансерное наблюдение. По данным контрольных обследований признаков прогрессирования заболевания не наблюдается.

Пример №2

Пациент А., 49 лет, поступил в отделение 26.03.2019 года с диагнозом: нейроэндокринная опухоль (Ki-67 1%) восходящей ободочной кишки T2N0M0 stI, кл.гр.2. Согласно клиническим рекомендациям, была выполнена гемиколэктомия правосторонняя с расширенной лимфаденэктомией. По результатам патоморфологического исследования операционного материала был подтвержден диагноз нейроэндокринной опухоли на основании положительной экспрессии стандартных иммуногистохимических маркеров: хромогранина А, синаптофизина. При молекулярно-генетическом исследовании опухоли подтвержден статус гиперметилирования генов *APC1*, *MGMT*, *RASSF1A*, *RUNX3* и гипометилирование ретротранспозона *LINE-1* ($\text{Met}_{\text{LINE}} \leq 72\%$, $\text{Met}_{\text{APC1}} \geq 11\%$, $\text{Met}_{\text{MGMT}} \geq 10,5\%$, $\text{Met}_{\text{RASSF1A}} \geq 12\%$ и $\text{Met}_{\text{RUNX3}} \geq 10\%$). Ожидая неблагоприятное течение заболевания, больному выполнялась компьютерная томография органов брюшной полости с интервалом в 1 месяц. В мае 2020 года у пациента было выявлено прогрессирование заболевания с метастатическим поражением S5-S6 сегментов печени. Пациент умер спустя 1 месяц после выявления прогрессирования. Таким образом, несмотря на верифицированный диагноз нейроэндокринной опухоли ободочной кишки (G1, Ki-67 = 1%), традиционно считающейся новообразованием с относительно доброкачественным клиническим течением, онкологический процесс отличился агрессивным характером. Оценка эпигенетического статуса генов позволило спрогнозировать риск неблагоприятного исхода заболевания.

Технико-экономическая эффективность «Способа прогнозирования клинического течения нейроэндокринных новообразований толстой кишки» позволяет на дооперационном этапе выделять две категории пациентов на основании благоприятного и неблагоприятного прогноза клинического течения заболевания, соответственно, и определять рациональную тактику ведения пациента.

Заявляемый способ является экономически оправданным для уточнения предоперационного диагноза, позволяет своевременно определить молекулярный подтип нейроэндокринного новообразования толстой кишки.

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования клинического течения нейроэндокринных новообразований толстой кишки заключается в том, что у пациента производят забор биопсийного образца опухолевой ткани, образцы замораживают в жидком азоте для транспортировки в лабораторию и для хранения, выделение геномной ДНК из ткани проводят следующим образом: фрагменты ткани измельчают скальпелем и/или ножницами, помещают в лизирующий раствор, дальнейшее выделение ДНК проводят по методу фенол-хлороформной экстракции, выделенную ДНК обрабатывают в ходе бисульфитной конверсии с помощью набора EpiJET Bisulfite Conversion Kit, Thermo Scientific, анализируемые последовательности генетических локусов амплифицируют в 35 мкл ПЦР-смеси, содержащей 1х ПЦР-буфер, 0,2 mM dNTPs, MgCl₂, 1 ед. акт. Taq-DNA-полимеразы, по 0,4 мкМ прямого и обратного праймеров, амплификацию проводят на термоциклере в соответствии с инструкциями производителя по следующей программе: первичная денатурация: 95°C 5 мин., 45 циклов: 95°C 20 с; 72°C 20 с, терминальное удлинение цепи 72°C 10 мин, ампликоны, полученные после постановки ПЦР на матрице бисульфит-конвертированной ДНК, подвергают очистке, денатурации и отмывке с последующим отжигом с секвенирующим праймером при 80°C и постановкой реакции пиросеквенирования с использованием системы генетического анализа PyroMark Q24, Qiagen, Germany согласно инструкции производителя, постановку пиросеквенирования каждого образца проводят, как минимум, в двух повторах, полученные данные анализируют с помощью программного обеспечения PyroMark Q24 Software, Qiagen, Germany, значение метилирования отдельного CpG-сайта используют для вычисления усредненного метилирования промоторного участка каждого гена (Met, %), при статусе метилирования Met_{LINE1} более 72%, Met_{APC1} менее 11%, Met_{MGMT} менее 10,5%, Met_{RASSF1A} менее 12% и Met_{RUNX3} менее 10% следует ожидать благоприятного клинического течения нейроэндокринных новообразований толстой кишки, а при значениях Met_{LINE} меньше или равно 72%, Met_{APC1} больше или равно 11%, Met_{MGMT} больше или равно 10,5%, Met_{RASSF1A} больше или равно 12% и Met_{RUNX3} больше или равно 10%, напротив, следует ожидать неблагоприятного клинического течения нейроэндокринных новообразований толстой кишки.